

**STUDIEN ZUR ANTIGENITÄT
DES MENSCHLICHEN MELANOMS
UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG
SEINER MÖGLICHEN VIRUSÄTIOLOGIE**

Hans-Dieter Eberhard

1976

AUS DEM INSTITUT FÜR CHIRURGISCHE FORSCHUNG
(Prof. Dr. Dr. h.c. W. Brendel)
AN DER CHIRURGISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
(Prof. Dr. G. Heberer)

STUDIEN ZUR ANTIGENITÄT DES MENSCHLICHEN MELANOMS
UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG SEINER MÖGLICHEN
VIRUSÄTIOLOGIE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Hans-Dieter Eberhard
aus Braunschweig

München 1976

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. h. c. Brendel

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 22. 6. 1976



Meinen Eltern

Seite

1.1.1. Mein Vater	1
1.1.2. Mein Mutter	2
1.1.3. Mein Großvater	3
1.1.4. Mein Großmutter	4
1.1.5. Mein Onkel	5
1.1.6. Mein Tante	6
1.1.7. Mein Cousin	7
1.1.8. Mein Nichte	8
1.1.9. Mein Bruder	9
1.1.10. Mein Schwester	10
1.1.11. Mein Freund	11
1.1.12. Mein Freundin	12
1.1.13. Mein Kollege	13
1.1.14. Mein Klassenkasse	14
1.1.15. Mein Klassenkasse	15
1.1.16. Mein Klassenkasse	16
1.1.17. Mein Klassenkasse	17
1.1.18. Mein Klassenkasse	18
1.1.19. Mein Klassenkasse	19
1.1.20. Mein Klassenkasse	20
1.1.21. Mein Klassenkasse	21
1.1.22. Mein Klassenkasse	22
1.1.23. Mein Klassenkasse	23
1.1.24. Mein Klassenkasse	24
1.1.25. Mein Klassenkasse	25
1.1.26. Mein Klassenkasse	26
1.1.27. Mein Klassenkasse	27
1.1.28. Mein Klassenkasse	28
1.1.29. Mein Klassenkasse	29
1.1.30. Mein Klassenkasse	30
1.1.31. Mein Klassenkasse	31
1.1.32. Mein Klassenkasse	32
1.1.33. Mein Klassenkasse	33
1.1.34. Mein Klassenkasse	34
1.1.35. Mein Klassenkasse	35
1.1.36. Mein Klassenkasse	36
1.1.37. Mein Klassenkasse	37
1.1.38. Mein Klassenkasse	38
1.1.39. Mein Klassenkasse	39
1.1.40. Mein Klassenkasse	40
1.1.41. Mein Klassenkasse	41
1.1.42. Mein Klassenkasse	42
1.1.43. Mein Klassenkasse	43
1.1.44. Mein Klassenkasse	44
1.1.45. Mein Klassenkasse	45
1.1.46. Mein Klassenkasse	46
1.1.47. Mein Klassenkasse	47
1.1.48. Mein Klassenkasse	48
1.1.49. Mein Klassenkasse	49
1.1.50. Mein Klassenkasse	50
1.1.51. Mein Klassenkasse	51
1.1.52. Mein Klassenkasse	52
1.1.53. Mein Klassenkasse	53
1.1.54. Mein Klassenkasse	54
1.1.55. Mein Klassenkasse	55
1.1.56. Mein Klassenkasse	56
1.1.57. Mein Klassenkasse	57
1.1.58. Mein Klassenkasse	58
1.1.59. Mein Klassenkasse	59
1.1.60. Mein Klassenkasse	60
1.1.61. Mein Klassenkasse	61
1.1.62. Mein Klassenkasse	62
1.1.63. Mein Klassenkasse	63
1.1.64. Mein Klassenkasse	64
1.1.65. Mein Klassenkasse	65
1.1.66. Mein Klassenkasse	66
1.1.67. Mein Klassenkasse	67
1.1.68. Mein Klassenkasse	68
1.1.69. Mein Klassenkasse	69
1.1.70. Mein Klassenkasse	70
1.1.71. Mein Klassenkasse	71
1.1.72. Mein Klassenkasse	72
1.1.73. Mein Klassenkasse	73
1.1.74. Mein Klassenkasse	74
1.1.75. Mein Klassenkasse	75
1.1.76. Mein Klassenkasse	76
1.1.77. Mein Klassenkasse	77
1.1.78. Mein Klassenkasse	78
1.1.79. Mein Klassenkasse	79
1.1.80. Mein Klassenkasse	80
1.1.81. Mein Klassenkasse	81
1.1.82. Mein Klassenkasse	82
1.1.83. Mein Klassenkasse	83
1.1.84. Mein Klassenkasse	84
1.1.85. Mein Klassenkasse	85
1.1.86. Mein Klassenkasse	86
1.1.87. Mein Klassenkasse	87
1.1.88. Mein Klassenkasse	88
1.1.89. Mein Klassenkasse	89
1.1.90. Mein Klassenkasse	90
1.1.91. Mein Klassenkasse	91
1.1.92. Mein Klassenkasse	92
1.1.93. Mein Klassenkasse	93
1.1.94. Mein Klassenkasse	94
1.1.95. Mein Klassenkasse	95
1.1.96. Mein Klassenkasse	96
1.1.97. Mein Klassenkasse	97
1.1.98. Mein Klassenkasse	98
1.1.99. Mein Klassenkasse	99
1.1.100. Mein Klassenkasse	100

Inhaltsverzeichnis

	Seite
0. Einleitung	1
1. Material und Methoden	5
1.1. Biochemischer Teil	5
1.1.1. Bestimmung der Aktivität einer RNA-ge- steuerten DNA-Polymerase (umgekehrte Transkriptase)	5
1.1.2. Nachweis einer charakteristischen 70-S- RNA im Melanom	7
1.1.3. Elektronenoptischer Nachweis virusähn- licher Partikel in der Fraktion Mc-P-100 menschlicher Melanome	8
1.2. Immunologischer Teil	9
1.2.1. Aufarbeitung der Tumoren	9
1.2.2. Immunisierung von Kaninchen	11
1.2.3. Absorption der Seren	12
1.2.4. Immundiffusion nach OUCHTHERLONY	13
1.2.5. Hämagglutination und Zytotoxizität	13
2. Ergebnisse	14
2.1. Biochemischer Teil	14
2.1.1. Aktivität der reversen Transkriptase	14
2.1.2. Nachweis einer einsträngigen 70-S-RNA	17
2.1.3. Nachweis elektronenoptischer Partikel	19
2.2. Immunologischer Teil	23
2.2.1. Seren gegen Melanomhomogenat	23
2.2.2. Seren gegen Überstände ultrazentrifu- gierter Melanomhomogenate	37
2.2.3. Seren gegen mikrosomale Fraktionen menschlicher Melanomzellen	45
2.2.4. Hemmung der Aktivität der RNA-abhängi- gen DNA-Polymerase	51

	Seite
2.2.5. Spezifität der Antigene	53
3. Diskussion	58
3.1. Viren als Ursache der Zelltransformation	58
3.1.1. Kriterien für den Nachweis onkogener RNA-Viren	60
3.2. Tumورimmunologie	63
3.2.1. Antigenität von Tumoren	64
3.2.1.1. Antigenität experimenteller Tumoren	65
Antigenität chemisch induzierter Tumoren	66
Antigenität virusinduzierter Tumoren	67
3.2.1.2. Antigenität menschlicher Tumoren	69
Nachweis tumorspezifischer Antigene mit Hilfe xenogener Antiseren	71
3.2.2. Immunologische Abwehr und Tumорwachstum	75
3.2.2.1. Zelluläre Antikörper in tumortragenden Organismen	77
3.2.2.2. Humorale Antikörper in tumortragenden Organismen	80
3.2.2.3. Immunologische Tumорabwehr und blockierende Faktoren	83
3.2.3. Klinische Tumорimmunologie	85
3.2.3.1. Aktive unspezifische Immunisierung	86
3.2.3.2. Aktive spezifische Immunisierung	87
3.2.3.3. Passive unspezifische Immunisierung	88
3.2.3.4. Passive spezifische Immunisierung	89
3.2.3.5. Klinische Möglichkeiten auf der Basis einer Virusätiologie	91
4. Zusammenfassung	94
5. Literaturverzeichnis	96

Verzeichnis der Abkürzungen

Mc-P-100	: Mikrosomenfraktions-Pellet bei 100 000 g
Tu 1 - 6	: Melanom Nr. 1 - 6
h	: Homogenat
u	: Ultrazentrifugat
mi	: mitochondriale Fraktion
m	: mikrosomale Fraktion Mc-P-100
m 1 - 6	: 1. - 6. Peak von Mc-P-100
K	: natives Kaninchen-anti-Melanom-Serum
aK	: an menschliche Serumproteine absorbiertes Kaninchen-anti-Melanom-Serum
EaK	: an menschliche Erythrozyten absorbiertes Kaninchen-anti-Melanom-Serum
S	: normales menschliches Serum
Sk	: normale menschliche Haut
dATP	: Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	: Desoxycytidintriphosphat
dGTP	: Desoxyguanosintriphosphat
TTP	: Thymidintriphosphat

0. Einleitung

Die Annahme, daß das Wachstum bösartiger Tumoren mit dem Auftreten neuer und spezifischer Antigeneigenschaften verbunden sei, wurde in den letzten 15 Jahren durch eine Fülle experimenteller Befunde bestätigt. Die neu entdeckten Antigene sind nicht nur Ausdruck morphologischer Veränderungen von Krebszellen, sondern können zugleich Hinweise auf die mögliche Ätiologie eines Tumors geben. So treten in einzelnen chemisch induzierten Tumoren jeweils unterschiedliche Antigene auf, auch wenn das Tumorstadium vom gleichen Carcinogen ausgelöst wird. Virus-induzierte Tumoren besitzen dagegen gleiche Antigene wenn sie vom gleichen Virus erzeugt werden.

Die Entdeckung der Immunogenität von Tumoren weckte nicht nur die Hoffnung auf erfolgreiche Immunodiagnose und -therapie wenigstens einiger Krebsarten, sondern förderte auch das Verständnis der Krebsentstehung, das jahrelang durch die Vorherrschaft der chemischen Carcinogenese als der maßgeblichen Krebsentstehungstheorie eingeengt worden war.

Zweifellos bietet die Theorie einer viralen Induktion von Tumoren den größten Erklärungsbereich. Neoplastische Zellen entfalten ein Wachstum, das zwar ungeordnet und wuchernd verläuft, das aber in sich eine neue Gesetzmäßigkeit entwickelt, die sich der übergeordneten Kontrolle des Wirtsorganismus zu entziehen vermag. Ein derartiges Verhalten ist bündig nur durch Veränderungen im genetischen Apparat der Zelle zu erklären. Daß chemische Substanzen allein die Transformation von Zellen bewirken könnten, ist kaum vorstellbar. Wahrscheinlich werden Zellen, die der Einwirkung von Chemi-

kalien ausgesetzt sind, derart geschädigt, daß sie ihre Teilungsfähigkeit verlieren und zugrunde gehen (SANDRITTER 1974). Eine Eigenart von Krebszellen ist aber gerade ihre gesteigerte Mitoserate.

Die Virustheorie bietet dagegen einen Ansatz zum Verständnis der molekular- und zellbiologischen Vorgänge, die eine Zelle transformieren können.

Als Folge der Transformation entwickeln Tumorzellen neue tumorspezifische Antigeneigenschaften, die vom betroffenen Organismus als immunologisch fremd erkannt und mit einer Abwehrreaktion beantwortet werden. Ein solider Tumor kann wahrscheinlich erst dann entstehen, wenn das System der immunologischen Überwachung durch Krankheit geschädigt oder durch therapeutische Maßnahmen unterdrückt wird.

Dieses Konzept der Krebsentstehung stützt sich nicht zuletzt auf klinische Beobachtungen. Z.B. erkranken Patienten, die aufgrund einer Organtransplantation immunsupprimiert werden, besonders häufig an malignen Tumoren.

Während die virale Ätiologie und die Entstehung von spezifischen tumor-assoziierten Antigenen für eine Reihe tierischer Tumoren als gesichert zu betrachten ist, gibt es bei menschlichen Tumoren bisher keine schlüssigen experimentellen Beweise sondern nur Indizien für eine virus-induzierte Onkogenese.

Diese Situation ist dadurch bedingt, daß beweiskräftige in-vivo-Versuche, wie z.B. die Übertragung eines Tumors durch zellfreie Extrakte, nur im Tierexperiment möglich sind. Deshalb gewinnen immunologische Studien für den Nachweis von Viren in menschlichen Tumoren besondere Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit wird die Antigenität des menschlichen Melanoms untersucht. Dieser wegen seiner

starken Metastasierung überaus bösartige Tumor hat aufgrund seines ungewöhnlichen klinischen Verhaltens immer wieder immunologisches Interesse erregt. Zu diesen Besonderheiten des Melanoms gehört eine im Vergleich zu anderen Krebsen außerordentlich hohe Rate an Spontanremissionen. Obwohl vollständige und bleibende Remissionen nur in ca. 1% der Fälle vorkommen, beträgt immerhin der Anteil an partiellen und zeitlich begrenzten Remissionen 5 - 15% (EVERSON 1966; HELLSTRÖM 1972). Das macht innerhalb der Rate der Spontanregressionen aller menschlicher Tumoren eine Rate von 15% aus, obwohl das Melanom nur mit 1 - 3% an den malignen Neoplasien des Menschen beteiligt ist (KOPF 1971).

Bemerkenswert an diesen Remissionen ist, daß sie zu einem schnellen Abbau nicht nur größerer Tumormassen sondern sogar fortgeschrittener Metastasen führen können (MOORE 1971).

Derartige Phänomene lassen sich durch die Annahme eines starken immunologischen Mechanismus erklären, der das Abwehrsystem vermutlich durch einen tumorspezifischen, antigenen Reiz in die Lage versetzt, den Tumor als körperfremdes Gewebe abzustoßen. Zum Beispiel wurden mit den Seren von Patienten, die die Spontanremission eines Melanoms erlebt hatten, andere Melanompatienten immuntherapiert. Die Erfolge, die in einigen Fällen erzielt wurden (HELLSTRÖM 1972; SUMNER 1960; TEIMOURIAN 1962), unterstreichen die Bedeutung der humoralen Immunabwehr im Fall des malignen Melanoms.

Eine weitere Besonderheit im klinischen Verhalten des Melanoms, die auf immunologische Mechanismen hinweist, besteht in seiner Tendenz, in einigen Fällen

Monate oder gar Jahre als Primärtumor lokalisiert zu bleiben, in anderen Fällen innerhalb kürzester Zeit ausgedehnt zu metastasieren, oder schließlich nach Remission des Primärtumors Metastasen der Lymphknoten zurückzulassen (LEWIS 1968).

Diese klinischen Daten gaben zu zahlreichen Studien Anlaß, die die Beschaffenheit der immunologischen Interaktion zwischen Wirt und Tumorzelle untersucht haben. Dabei wurden an der Membran und im Zytoplasma von Melanomzellen Antigene entdeckt, die an normalen Zellen nicht gefunden werden konnten (GOODWIN 1972; LEWIS 1973). Die biochemischen Eigenschaften und die biologische Funktion dieser Antigene blieben jedoch unbekannt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, mit Hilfe xenogener Antiseren tumorspezifische Antigene nachzuweisen, die mit dem Melanom assoziiert sind. Dabei soll ein experimentelles System entworfen werden, in dem nicht nur die Antigenität des Melanoms berücksichtigt wird, sondern auch die Frage, ob diese Antigene viralen Ursprungs seien. Die immunologischen Experimente gehen deshalb vom biochemischen Nachweis viraler Indizien im Melanom aus. Besonderer Wert wird dabei auf ein virusspezifisches Enzym gelegt, bei dem es sich um eine RNA-gesteuerte DNA-Polymerase handelt. Diese sogenannte reverse oder umgekehrte Transkriptase ist für die Infektiosität eines RNA-Tumovirus essentiell und scheint deshalb eine Schlüsselrolle bei der malignen Transformation einer Zelle zu spielen. Zugleich stellt dieses Enzym ein gruppenspezifisches Antigen dar.

Ein derartiges Vorgehen bietet die Möglichkeit, daß das Enzym als virusspezifisches Tumor-Antigen aufgrund seiner Aktivität indentifiziert und isoliert werden kann. Zugleich könnte dessen mögliche biologische Funktion bei der Genese des Melanoms ermittelt werden.

1. Material und Methoden

1.1. Biochemische Untersuchungen¹⁾

1.1.1. Bestimmung der Aktivität der RNA-gesteuerten DNA-Polymerase umgekehrte Transkriptase

Zum Nachweis der Aktivität der RNA-abhängigen DNA-Polymerase oder umgekehrten Transkriptase wurde das Tumormaterial in Tris-EDTA-Puffer (pH 8,3) gewaschen und suspendiert. Nach Homogenisierung im Ultraturax-Homogenisator²⁾ bei Stufe 7,5 über 20 sec. wurde der Gewebebrei durch vier Lagen Mull filtriert und zu dem Filtrat 1/10 des Volumens an Glycerin zugegeben. Dieses Homogenat wurde 5 min. bei 2500 x g zentrifugiert, das entstandene Sediment nochmals im Ultraturax homogenisiert und erneut bei 2500 x g zentrifugiert. Beide Überstände wurden 20 min. bei 12 000 x g sedimentiert und die neuen Überstände auf 30%-iges Glycerin in Tris-EDTA überschichtet und bei 100 000 x g 2 h im BECKMAN-SW-27-Rotor zentrifugiert. Das Sediment, das die rohe mikrosomale Fraktion darstellte und Mc-P-100 (Mikrosomenfraktionspellet bei 100 000 x g) genannt wurde, wurde auf einen diskontinuierlichen

1) Die biochemischen und elektronenmikroskopischen Tests wurden von Fräulein A. Reichert am Institut für Zellbiologie (Vorstand: Prof. Dr. Fritz Miller) durchgeführt.

2) Fa. Janke und Kunkel, Staufen

Saccharose-Gradienten aufgetragen (je 2 ml 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%-ige Lösung in Tris-EDTA) und bei $100\,000 \times g$ 16 h zentrifugiert (BECKMAN-SW-40-Rotor). Die Gradienten wurden mit 60%-iger Saccharose eluiert und gleichzeitig die Proteingipfel bei 280 nm aufgezeichnet.

Die Aktivität der reversen Transkriptase in den einzelnen Peaks wurde nach der von GARAPIN (1970) angegebenen Methode gemessen. Im Testansatz wurden 0,2 ml Standardreaktionslösung (bestehend aus: 80 mM Tris-Cl (pH 8,3), 10 mM $MgCl_2$, 12,5 mM NaCl, je 2 mM dATP, dCTP, dGTP) mit 0,02 ml 3H -TTP zusammengegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,02 ml (= ca. 0,15 mg Protein) der Protein-Enzymlösung mit der Stoppuhr gestartet. Das Protein war vorher 15 min. bei $0^\circ C$ zusammen mit 1%-igem Triton-X-100 und 0,25 M Dithiothreitol im Verhältnis 10:1:1 inkubiert worden.

Nachdem die Reaktion 15 min. bei $37^\circ C$ gelaufen war, wurde sie mit 0,5 ml 15%-iger Trichloressigsäure (TCA) gestoppt. Die Proben wurden je zweimal in 15%-iger TCA und 5%-iger TCA und in Äthanol-Äther (3:1) gewaschen. Das Pellet wurde in 0,1 ml HCOOH gelöst und mit 15 ml Szintillatorflüssigkeit versetzt.

Die Radioaktivität der Proben wurde im PACKARD-Szintillationszähler bestimmt. Als spezifische Aktivität des Enzyms wurde die Zahl der Impulse pro Minute pro mg Protein nach 15 oder 30 min. Inkubationszeit definiert. Bei den Versuchen zur Stimulation der reversen Transkriptase wurde dem Reaktionsgemisch poly-dTrA zugegeben, bei den Hemm-

versuchen wurde mit Aktinomycin D¹⁾, Ethidiumbromid¹⁾ oder Antiserum inkubiert.

1.1.2. Nachweis einer charakteristischen 70-S-RNA im Melanom

Das Vorhandensein einer für onkogene RNA-Viren typischen 70-S-RNA der subzellulären Fraktion von Melanomgewebepräparationen wurde im "simultaneous-detection-test" nach SCHLOM & SPIEGELMAN untersucht.

Das Tumorgewebe wurde analog zu 1.1.1. aufgearbeitet. Im Testansatz wurden 0,3 ml Standardlösung (s. 1.1.1.) mit 0,1 ml ³H-TTP und 0,05 ml Protein-Enzym-Lösung, die vorher 15 min. mit 0,005 ml Triton-X-100 und 0,005 ml Dithiothreitol inkubiert worden war und ca. 0,3 mg Protein enthielt, zusammengegeben. Nach 15 min. Reaktionszeit bei 37°C wurde die Reaktion gestoppt durch Zugabe von 0,3 ml 0,4 M NaCl, 2% SDS (Sodiumdodecylsulfate), 0,04 ml DPC (Diäthylpyrocarnat) und 0,6 ml Phenol-m-Kresol, der Ansatz 10 min. bei 25°C geschüttelt und bei 13 000 rpm 5 min. zentrifugiert.

Die wässrige Phase wurde auf Glyceringradienten aufgetragen (10 - 30% in Tris-EDTA) und 5 h bei 40 000 rpm zentrifugiert. Die Fraktionen wurden mit 40%igem Glycerin in H₂O eluiert. Jede Fraktion (ca. 0,4 ml) wurde mit 0,04 mg RNA (Hefe) und

1) Fa. SERVA, Heidelberg

kalttem absoluten Äthanol ausgefällt und mit flüssigem N_2 kurz eingefroren. Darauf wurden die Proben zweimal mit Äthanol-Äther gewaschen und mit Äther getrocknet. Die Pellets wurden mit 0,1 ml $HCOOH$ gelöst, mit Szintillationsflüssigkeit versetzt und die Radioaktivität gemessen.

1.1.3. Elektronenoptischer Nachweis virusähnlicher Partikel in der Fraktion Mc-P-100 menschlicher Melanome

Von den subzellulären Fraktionen wurden vor der Einbettung ca. 0,01 - 0,05 ml Proteinsuspension mit 1 ml 1%-igem OsO_4 in 0,1 M Cacodylat-Puffer 60 min. bei $4^\circ C$ fixiert und anschließend 5 min. mit der BECKMAN-swing-out-Zentrifuge bei 3000 rpm zentrifugiert. Die Proben wurden zweimal mit 0,1 M Cacodylat und 0,5 ml 0,5%-igem Uranylacetat gewaschen, bevor sie in einer Alkoholreihe entwässert wurden (70%, 95%, 100%). Die Proben wurden in Glasgefäße überführt und die Pellets geteilt, um dann bei $4^\circ C$ je einmal mit 95%-igem und 100%-igem Alkohol 10 min. stehengelassen zu werden. Der gleiche Vorgang wurde bei Zimmertemperatur je 10 min. zweimal mit absolutem Alkohol und zweimal mit Propylenoxid wiederholt. Die Proben wurden dann über Nacht in Epon-Propylenoxid (1:1) mit geschlossenem Deckel und am darauffolgenden Tag mit geöffneten Deckel ruhen gelassen. Dann wurde die Einbettung in Epon 812¹⁾ durchge-

1) Schell GmbH

führt. Ultradünne Schnitte wurden mit einem Diamantmesser an einem LKB Ultratom III angefertigt und auf Kupfernetze aufgezogen. Die Nachkontrastierung erfolgte mit Magnesiumuranylacetat und mit Bleizitrat. Die Schnitte wurden in einem SIEMENS-Elmiskop I oder 101 bei einer Strahlspannung von 80 kV und einer 50 μ -Objektivblende untersucht. Aufnahmen wurden in einem Vergrößerungsbereich von 6000 bis 180 000 gemacht.

1.2. Immunologischer Teil

1.2.1. Aufarbeitung der Tumoren

Bei dem ersten Melanom (Tu 1), von dem ein Homogenat zur Immunisierung eingesetzt wurde, handelte es sich um ein Operationspräparat von subaxillären, subkutanen amelanomtischen Metastasen eines malignen Melanoms. Nur ein Teil des Tumormaterials wurde sofort homogenisiert, der Rest wurde bei -80°C eingefroren. Das Gewebe wurde gespült, weitgehend von Fett und Bindegewebe befreit und mit der Schere in kleine Stückchen geschnitten. Diese wurden durch ein feines Drahtnetz passiert und in Ringers Laktat (pH 7,2) aufgefangen. Der Tumorbrei wurde in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator¹⁾ weiter aufgearbeitet. Die entstandene Gewebesuspension wurde 5 min. bei 2500 x g zentrifugiert und

1) Fa. Braun Melsungen

der Überstand zur Immunisierung eingesetzt.

Zwei weitere Melanommetastasen wurden in gleicher Weise homogenisiert. Melanom 2 (Tu 2) war eine Hirnmetastase und das dritte Melanom (Tu 3) stammte von einer in der Regio pectoralis subkutan gewachsenen, amelanotischen Metastase. Die Homogenate dieser Tumoren wurden anschließend bei 100 000 x g zentrifugiert und der Überstand zur Immunisierung eingesetzt, nachdem der Proteingehalt auf 1g% eingestellt worden war. Die Konzentration der löslichen Proteine wurde nach der Biuret-Methode bestimmt.

Bei den weiteren Melanomen (Tu 4, 5, 6) handelte es sich um Metastasen, die sich im Fettgewebe (Tu 4) gebildet oder die subaxillären

Lymphknoten befallen hatten (Tu 5, 6). Von diesem Gewebe wurden zur Immunisierung diejenigen subzellulären Fraktionen eingesetzt, die nach Maßgabe der biochemischen Untersuchungen eine hohe Aktivität an umgekehrter Transkriptase aufwiesen. Die Tumoren wurden analog zu der unter 1.1.1. beschriebenen Präparation aufgearbeitet. Von Tu 6 konnte durch diese fraktionierte Zellzentrifugation nur so geringe Proteinmengen in den einzelnen Peaks erhalten werden, daß es für eine wirksame Immunisierung nicht ausgereicht hätte. Dieses Material wurde deshalb nur als Testantigen verwendet.

1.2.2. Immunisierung von Kaninchen

Mit je 1 ml des Homogenats von Tu 1 , vermischt mit dem gleichen Volumen kompletten Freundschens Adjuvans¹⁾, wurden insgesamt 32 Kaninchen beiderlei Geschlechts immunisiert. Je 10 Kaninchen wurden mit je 1 ml des Ultrazentrifugates (Tu 2,3) ebenfalls mit Freundschem Adjuvans immunisiert. Von Tu 4 wurde der 2. und 3. Peak der Gradientenzentrifugation (1.1.1.) und von Tu 5 der 4. und 5. Peak je einem Kaninchen verabreicht. Dabei standen Proteinmengen zur Verfügung, die es zuließen, bei jeder Immunisierung jedem Kaninchen ca. 3 mg Protein zu applizieren, die mit Ringers Laktat in ein Volumen von 1 ml aufgenommen und in 1 ml Freundschem Adjuvans emulgiert worden waren.

Das Antigen wurde den Kaninchen stets im gleichen zeitlichen Schema am 1., 3., 7., 14. und 21. Tag subkutan injiziert. Jeweils am 14. Tage wurde damit begonnen, das Ergebnis der bisherigen Immunisierungen im OUCHTHERLONY (s. 1.2.4.) zu verfolgen. Gewöhnlich wurden die Tiere am 28. Tag durch Herzpunktion entblutet, spätestens aber nach einer weiteren Boosterung am 35. Tag. Die Seren wurden nach einer Reinigung durch einstündige Ultrazentrifugation bei 100 000 x g in Portionen à 2 ml bei -25°C eingefroren.

1) Difco USA Vertrieb Otto Norwald, Hamburg

1.2.3. Absorption der Seren

Im ersten Schritt wurden die Seren gegen menschliches Serum von Spendern der Blutgruppe O absorbiert. Vor Absorption wurden die Seren bei 56°C über eine halbe Stunde im Wasserbad inaktiviert. Um die Konzentration der Antikörper in den Kaninchenserum nicht zu verringern, wurde das menschliche Serum in lyophilisierter Form verwendet. Dabei wurden in 1 ml Kaninchenserum bei einem normalen Proteingehalt von ca. 7 g% 70 mg des Lyophilisats eingewogen und gelöst. Dieser Ansatz wurde bei 37°C vier Stunden inkubiert und währenddessen häufig umgeschüttelt. Die Präzipitate wurden bei 100000 x g 1 h lang abzentrifugiert und der Überstand abgehoben.

Im zweiten Schritt wurden die Seren an Erythrozyten der Blutgruppe AB absorbiert. Zu den Kaninchenserum wurde jeweils ein gleiches Volumen an Erythrozyten gegeben, die vorher dreimal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen worden waren. Der Ansatz wurde eine Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert und dabei mehrfach vorsichtig umgeschüttelt. Die agglutinierten Erythrozyten wurden bei 3000 rpm abzentrifugiert und die Seren erneut mit Erythrozyten versetzt. Dieser Vorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt, bzw. so lange, bis makroskopisch keine Agglutination mehr sichtbar war. Die absorbierten Seren wurden, sofern sie nicht sofort weiter bearbeitet wurden, portioniert bei -25°C eingefroren.

1.2.4. Immundiffusion nach OUCHTHERLONY

Die Spezifität der Seren wurde im Doppeldiffusionstest nach OUCHTHERLONY untersucht. Auf Objektträger, die mit einer 2%-igen Agarlösung¹⁾ bestrichen worden waren, wurden je 2,5 ml einer 1,5%-igen Agarose-lösung¹⁾ aufgetragen (in 0,025 M Barbital-Puffer pH 8,6). Nach Erstarrung der Lösung wurden in das Gel Löcher von 5 mm Ø gestanzt, die von 6 Löchern mit einem Ø von 1mm umgeben waren. In die mittleren Löcher wurde jeweils das Kaninchen-anti-Melanomserum eingefüllt, in die umgebenden Löcher die Tumorantigene. Die Seren wurden vor und nach jedem Absorptionsschritt getestet, wobei als Kontrolle stets menschliches Serum und Homogenate normaler menschlicher Haut verwendet wurden. Als weitere Kontrolle diente das Serum eines unbehandelten Kaninchens sowie verschiedene standardisierte Kaninchen-anti-Seren gegen eine Reihe normaler menschlicher Proteine (s. 2.2.4.).

1.2.5. Hämagglutination und Zytotoxizität

Ebenfalls vor und nach jedem Absorptionsschritt wurde das Vorhandensein hämagglutinierender Antikörper mit Hilfe des Hämagglutinationstests (KABAT 1961) ermittelt, und die Aktivität von Antikörpern gegen menschliche Lymphozyten nach der von KISSMEYER & NIELSEN beschriebenen Methode bestimmt.

1) Behring - Werke

2. Ergebnisse

2.1. Biochemische Untersuchungen

2.1.1. Aktivität der reversen Transkriptase

Es wurden insgesamt 24 Fälle von primären Melanomen und 11 Lymphknotenmetastasen nach der Aktivität einer RNA-gesteuerten DNA-Polymerase untersucht. Wie Tabelle 1 zeigt, konnte eine solche Aktivität in allen Fällen demonstriert werden. In analogen Präparationen von normaler menschlicher Haut und einem Nävuszellnävus, die als Kontrollen dienten, wurde nur eine sehr geringe Aktivität gefunden. Auf der Tabelle ist weiterhin ein unterschiedlicher Hemmeffekt der Zytostatika Ethidiumbromid und Aktinomycin D auf die reverse Transkriptase dargestellt. In Untersuchungen über das Hamstermelanom A-Mel-3 (BIRKMAYER 1972) konnte eine tumorspezifische Sensibilität gegenüber Ethidiumbromid gezeigt werden. Demnach hat Ethidiumbromid eine inhibierende Wirkung auf den tumorspezifischen Nukleinsäurestoffwechsel, der von Aktinomycin D nur wenig berührt wird. Beim normalen Nukleinsäurestoffwechsel verhält es sich umgekehrt.

Um das Enzym anzureichern, wurde die Fraktion Mc-P-100 durch eine Gradientenzentrifugation aufgetrennt. Dabei ergab sich, daß die höchste Aktivität in einem Gipfel bei einer Dichte von $1,16 \text{ g/cm}^3$ zu finden war (Abb. 1). Die durchgezogene Linie auf der Abbildung stellt das Protein-Elutionsprofil dar, das bei einer optischen Dichte von 280 nm gemessen worden war. Die untere durchbrochene Linie zeigt die Enzym-

aktivität in cpm/mg Protein. Die obere gebrochene Linie stellt die Dichte in g/cm^3 dar.

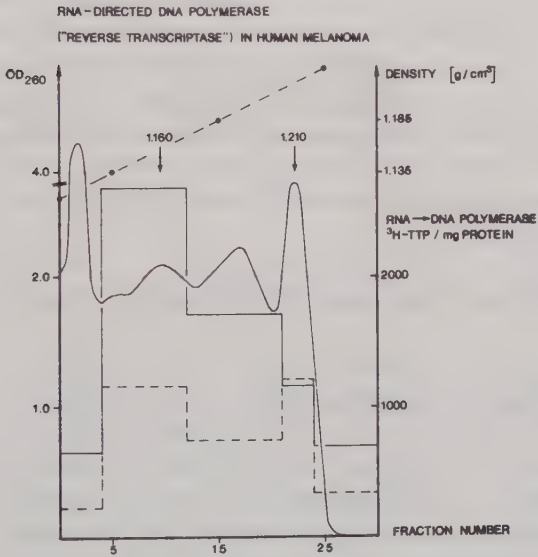


Abb. 1: Verteilung der reversen Transkriptase-Aktivität in Mc-P-100 nach Auftrennung im Saccharose-Dichtegradienten.

- Elutionsprofil, gemessen bei 280 nm
- Aktivität der umgekehrten Transkriptase in cpm/mg Protein
- Dichte in g/ml

Tab. 1: RNA-gesteuerte DNA-Polymerase ("Reverse Transkriptase") in einer subzellulären Fraktion Mc-P-100 eines menschlichen Melanoms

	Spezifische Aktivität (p-Mole ^3H -TMP eingebaut pro min. und pro mg Protein)	% Hemmung von Ethidiumbromid	Aktinomycin D
Normale menschliche Haut	$0.14 \times 10^{-2} \pm 0.00$	20	85
Nävuszellnävus	$0.08 \times 10^{-2} \pm 0.00$	22	85
Primäres menschliches Melanom	$1.37 \times 10^{-2} \pm 0.22$	78	30
Lymphknoten Metastasen	$1.32 \times 10^{-2} \pm 0.28$	82	35

Ein schwieriges Problem stellen die Kontrollen dar. Es ist fraglich, ob normale menschliche Haut überhaupt ein adäquates Kontrollgewebe zum Melanom sein kann. Geht man davon aus, daß melaninproduzierende Zellen das pathogenetische Ursprungsgewebe des Melanoms sind, so wären Melanozyten die beste Kontrolle. Es ist aber sehr schwierig, Melanozyten, die einen Anteil von 10% in der normalen Epidermis ausmachen, in verwertbaren Mengen zu isolieren. Es wurde deshalb Nävuszellnävus als Kontrollgewebe verwendet. Diese präformierte Pigmentläsion stellt bekanntlich einen häufigen Ursprungsort von Melanomen dar.

2.1.2. Nachweis einer einsträngigen 70-S-RNA

Als weiteres wichtiges Kriterium für das Vorkommen onkogener RNA-Viren wird der Nachweis einer einsträngigen hochmolekularen RNA angesehen, die im 70-S-Bereich sedimentiert. Mit Hilfe des "simultaneous-detection-test" konnte in den subzellulären Fraktionen des Melanoms, die auch eine reverse Transkriptase-Aktivität zeigten, eine derartige RNA-Spezies nachgewiesen werden. Der Test geht von folgender Überlegung aus: wenn an einer einsträngigen hochmolekularen RNA eine komplementäre DNA unter Katalyse der rückläufigen Transkriptase synthetisiert wird, und wenn eine der Nukleotiden radioaktiv markiert ist, so sollte nach Ablauf der Reaktion und einer entsprechenden Zentrifugation ein Radioaktivitätsgipfel in einem Bereich hoher Schwere zu finden sein. Dieser Gipfel wurde, wie Abbildung 2 zeigt, im 70-S-Bereich gefunden (Linie mit Punkten).

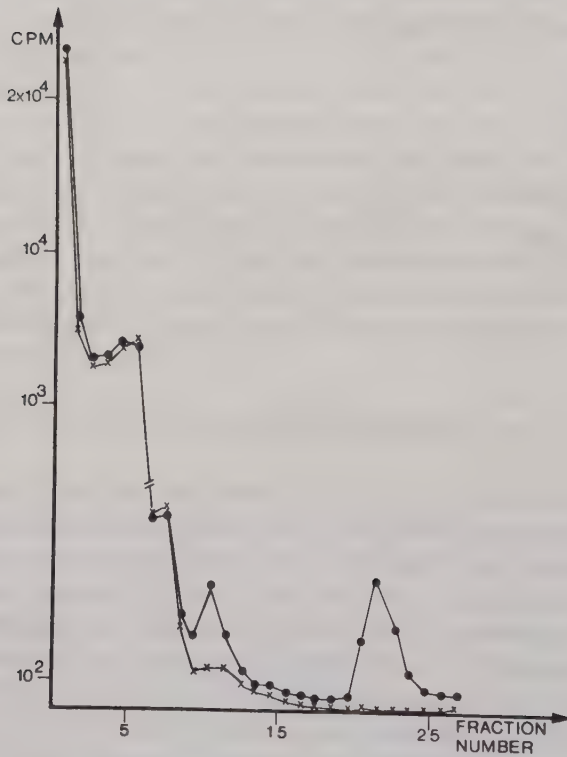


Abb. 2: Sedimentationsprofil 70-S-RNA

- Elutionsprofil der extrahierten Nukleinsäuren ohne RNase Einwirkung
- x-x-x- Elutionsprofil der extrahierten Nukleinsäuren mit RNase Einwirkung

Daß es sich bei dem hochmolekularen Nukleinsäuregipfel um eine RNA handelt, mit der das Produkt der umgekehrten Transkription verbunden war, kann aus dem Elutionsprofil nach RNase-Inkubation geschlossen werden. Durch RNase Einwirkung auf die extrahierten Nukleinsäuren wird der Nukleinsäuregipfel im hochmolekularen Bereich, gemessen an seiner Radioaktivität, abgebaut (Abb. 2).

2.1.3. Elektronenoptische Darstellung virusähnlicher Partikel im Melanom

In früheren Untersuchungen (BIRKMAYER 1972) konnten in ultradünnen Gewebeschnitten menschlicher Melanome Teilchen nachgewiesen werden, die eine Ähnlichkeit mit C-Typ-Viruspartikeln zeigen. Es handelte sich um runde Partikel mit einem elektronendichten Kern und einer doppelschichtigen Membran. Von transversal geschnittenen Prämelanosomen konnten die Teilchen dadurch unterschieden werden, daß ihr elektronendichter Kern anders als bei Prämelanosomen nicht bis an die Membran heranreichte, also im Durchmesser kleiner war. Vielmehr fanden sich in einigen Fällen feine Filamente, die vom Kern ausgehend speichenartig zur Membran zogen. Diese Speichenradstruktur war vorher bereits bei den im Hamstermelanom A-Mel-3 vorkommenden Viruspartikeln gefunden worden (BERNHARD 1964; DEPETRIS 1969; KELLOFF 1970; BIRKMAYER 1972).

Vor dem Hintergrund der biochemischen Befunde wurden in der vorliegenden Arbeit diejenigen subzellulären Fraktionen ultrastrukturell untersucht, in denen virale Eigenschaften gefunden worden waren.

Obwohl der Nachweis virusspezifischer Eigenschaften in bestimmten subzellulären Fraktionen das Vorhandensein intakter Viren keineswegs beweist - es ist sogar sehr wahrscheinlich, daß die intrazellulär synthetisierten, viralen Komponenten zwar vorhanden sind, aber noch nicht zum kompletten Virus zusammengebaut sind -, können Partikel beobachtet werden, die einen elektronendichten Kern besitzen, der von einer Membran umhüllt wird (Pfeile). Der mittlere Durchmesser der Partikel beträgt 120 nm. Die Teilchen besitzen eine große morphologische Ähnlichkeit mit onkogenen RNA-Viren vom C-Typ. Aufgrund der biochemischen Befunde läßt sich mit einiger Wahrscheinlichkeit annehmen, daß es sich hier um Viruspartikel handelt.

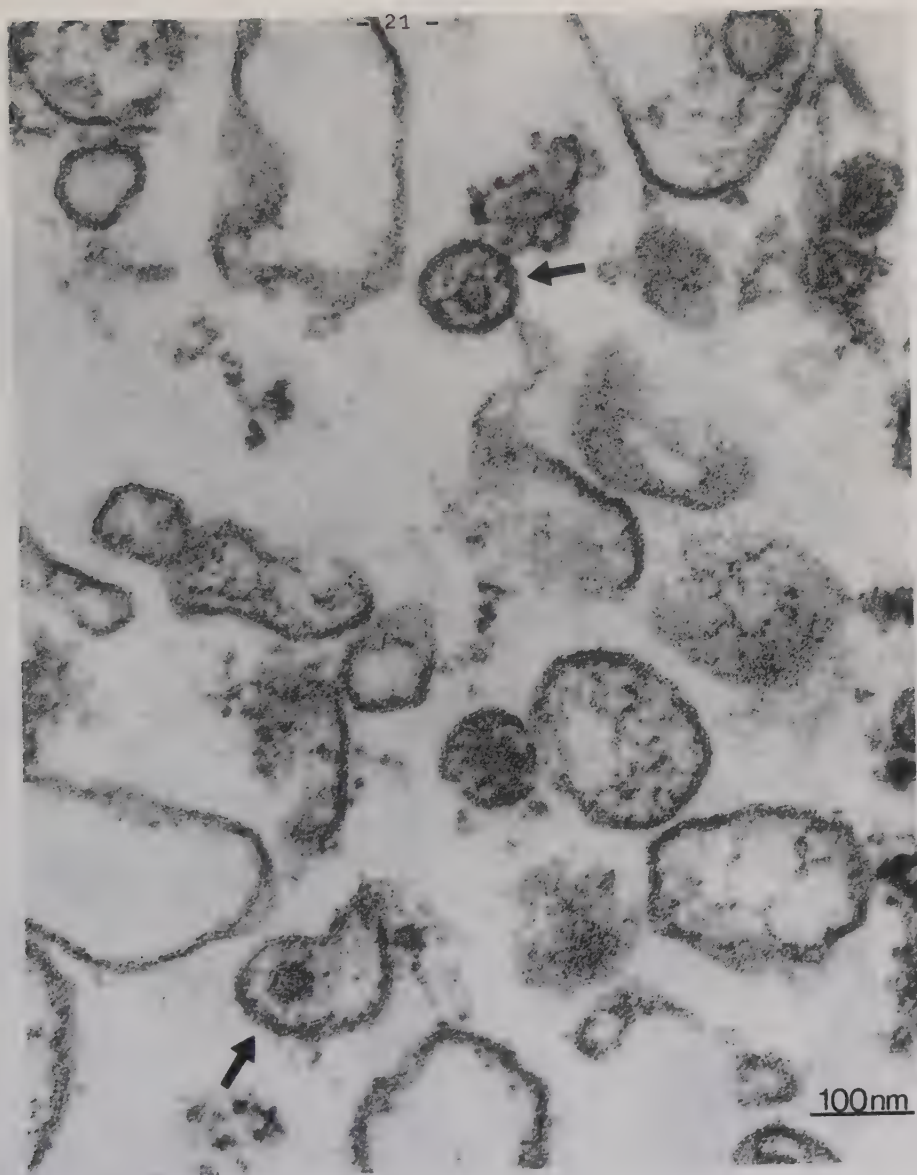


Abb. 3: Virusähnliche Partikel in der subzellulären Fraktion Mc-P-100, 2. Peak, Tu 4 (Pfeile).

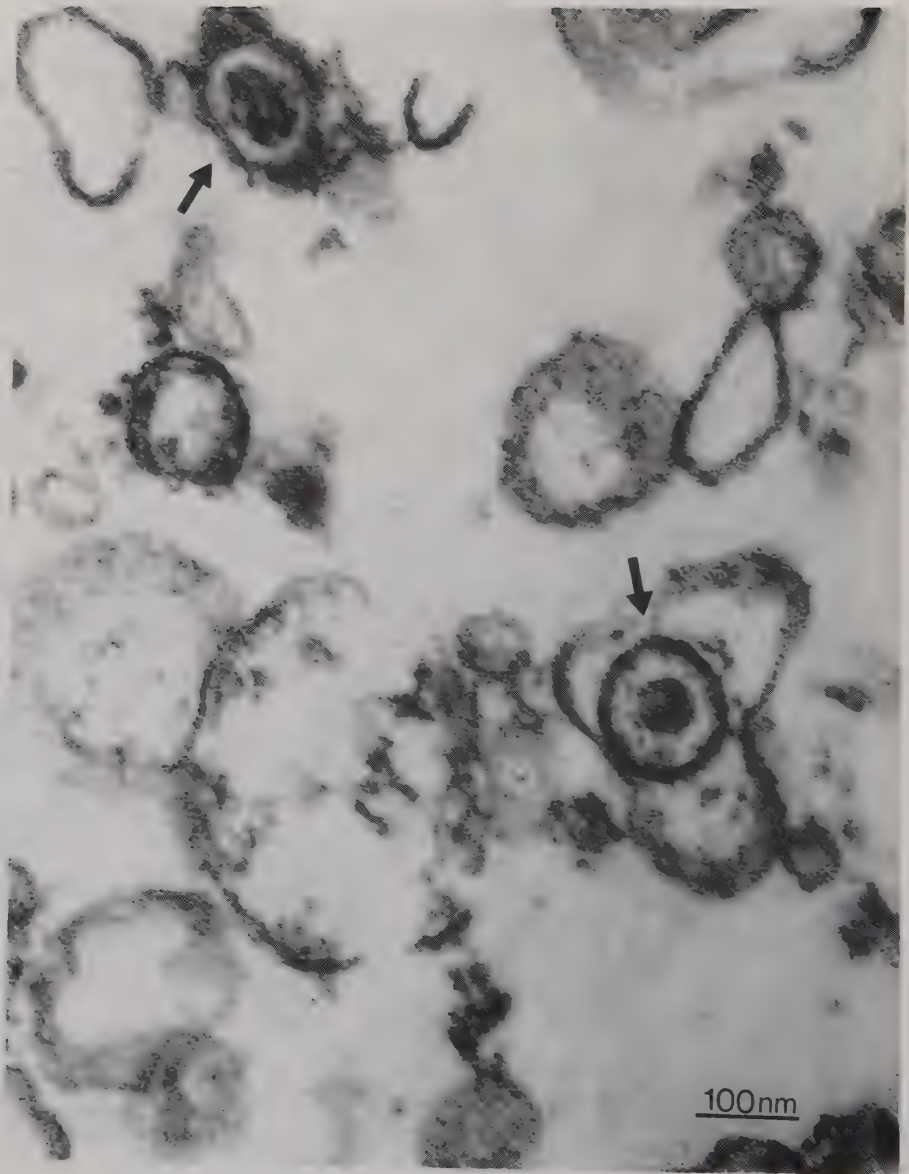


Abb. 4: Virusähnliche Partikel der subzellulären Fraktion Mc-P-100, 2. Peak von Tu 5 (Pfeile).

2.2. Immunologischer Teil

Auf der Basis der biochemischen Befunde wurde versucht, Antiseren gegen spezifisch mit dem Melanom auftretende Antigene herzustellen unter besonderer Berücksichtigung virusspezifischer Antigene.

Die in Kaninchen hergestellten Antiseren sollten insbesondere nach der Absorption an menschliche Serumproteine und rote Blutzellen im OUCHTHERLONY-Test gegen ein breites Spektrum von Melanomantigenen, die aufgrund der verschiedenartigen Präparationen der Tumorgewebe zur Verfügung standen, hinsichtlich ihrer Spezifität untersucht werden. Dabei sollte möglichst jedes Serum gegen jede Antigenpräparation getestet werden. Diese Absicht wurde teilweise dadurch limitiert, daß einige Präparationen nur in sehr geringen Mengen vorhanden waren, vor allem die subzellulären Fraktionen mit viraler Aktivität.

Von den Tumoren 1, 2 und 3 wurde jeweils das Homogenat und das Ultrazentrifugat verwendet, von den Tumoren 4, 5 und 6 die mikrosomale Fraktion Mc-P-100 und z.T. ihre einzelnen Peaks. Von Tumor 4 wurde in einigen Fällen auch die mitochondriale Fraktion eingesetzt.

2.2.1. Seren gegen Melanomhomogenat

Alle Seren der 32 mit einem Homogenat von Tu 1 immunisierten Kaninchen zeigten im nativen Zustand in der Doppeldiffusion ein breites Spektrum von Antikörpern gegen sämtliche getesteten Antigene einschließlich menschliches Serum und Hauthomogenat (Tab. 2).

der passiven Hämagglutination fanden sich mittlere Titer hämagglutinierender Antikörper (Tab. 3a). In 17 von 32 Seren waren zytotoxische Antikörper gegen menschliche Lymphozyten nachweisbar (Tab. 3b).

Nach Absorption der Seren an menschliche Serumproteine waren keine präzipitierenden Antikörper mehr gegen menschliches Serum nachweisbar. Stark verringert waren die Antikörper gegen ein Homogenat menschlicher Haut. Die Seren K 5, 8, 14 und 16 bildeten keine Linien mehr gegen die verwendeten Antigene aus (Tab. 4).

Die Absorption führte darüberhinaus zu einer deutlichen Reduktion hämagglutinierender und zytotoxischer Antikörper (Tab. 5a und 5b).

Um unspezifische Antikörper gegen normales menschliches Gewebe weiter zu eliminieren, wurden die Seren an menschliche rote Blutzellen der Gruppe AB absorbiert. Nach erschöpfender Absorption zeigten 14 von 32 Seren weder Präzipitationslinien gegen die Melanomhomogenate noch gegen die Ultrazentrifugate. Antikörper gegen Serumproteine oder Hauthomogenate waren in keinem Fall mehr nachweisbar. Alle 18 Seren, die noch mit Tu 1 reagierten, besaßen auch Antikörper gegen Homogenat und Ultrazentrifugat von Tu 2 und 3. Dabei reagierten 14 Seren mit Tu 2 und 3, während 4 Seren keine Linien gegen Tu 2 bildeten (Tab. 6).

Durch die erschöpfende Absorption wurden die hämagglutinierenden Antikörper beseitigt und die zytotoxischen Antikörper weitgehend reduziert (Tab. 7a und 7b).

Zusätzlich wurden die erschöpfend absorbierten Seren gegen die mikrosomalen Fraktionen Mc-P-100 aus Tu 4 und 5 getestet (Tab. 8). Es zeigte sich, daß noch 15 von 32 Seren mit den mikrosomalen Fraktionen entweder beider oder eines der Tumoren reagierte. Mit Mc-P-100 aus Tu 4 allein reagierte das Serum EaK 3, während die

Seren EaK 15, 18 und 30 nur gegen Mc-P-100 aus Tu 5 eine Präzipitationslinie bildeten.

Keine Reaktion konnte mehr beobachtet werden, wenn die Seren gegen einige der durch Gradientenzentrifugation erhaltenen Peaks diffundierten. Dieser Versuch wurde mit dem 2. und 3. Peak von Tu 4 und dem 2. Peak von Tu 5 durchgeführt (Tab. 8).

Wesentlich ist, daß die Antikörper gegen Homogenate und Ultrazentrifugate zweier allogener Tumoren reagieren. Damit scheint ein Antigen nachgewiesen zu sein, wie es LEWIS (1969) mit Hilfe der Immunfluoreszenz im Zytoplasma von Melanomzellen fand.

Wenn auch ein Teil der Seren gegen die mikrosomale Fraktion der Tumoren 4 und 5 reagierte, so ist es doch unwahrscheinlich, daß damit etwa die umgekehrte Transkriptase getroffen sein könnte, da sich keine Reaktion gegen die mikrosomalen Peaks mit der höchsten Aktivität des Enzyms fand. Die Ergebnisse geben keinen Hinweis auf eine biologische Bedeutung des Antigens. Vielleicht handelt es sich um ein Produkt virusinduzierter Zelltransformation.

Der Nachweis hämagglutinierender und zytotoxischer Antikörper sollte dazu dienen, den Effekt der Absorptionen und die Spezifität zu kontrollieren. Eine Korrelation zwischen Reaktivität der Seren gegen Melanom und dem Vorhandensein von hämagglutinierenden und zytotoxischen Antikörpern ließ sich nicht schlüssig finden. So hatte das Serum K 7 vor der Absorption den höchsten Häm-Titer von 1:1024, aber keine zytotoxischen Antikörper, nach der Absorption reagierte es noch gegen alle Tumoren. Das Serum EaK 25, das nach der Absorption noch sehr ausgeprägt gegen alle verwendeten melanomspezifischen Antigene reagierte, hatte vor der Absorption einen Häm-Titer

von 1:64. Dagegen hat das Serum K 11 den relativ hohen Titer von 1:256, zeigt aber nach der Absorption keinerlei Reaktion mehr. Hämagglutination und Zytotoxizität lassen demnach nur Aussagen über die Stärke unspezifischer Reaktionen zu. Aufgrund dieser Parameter und der Reaktivität der absorbierten Seren gegen Melanomgewebe ließ sich annehmen, daß ein tumorspezifisches Antigen nachgewiesen worden war.

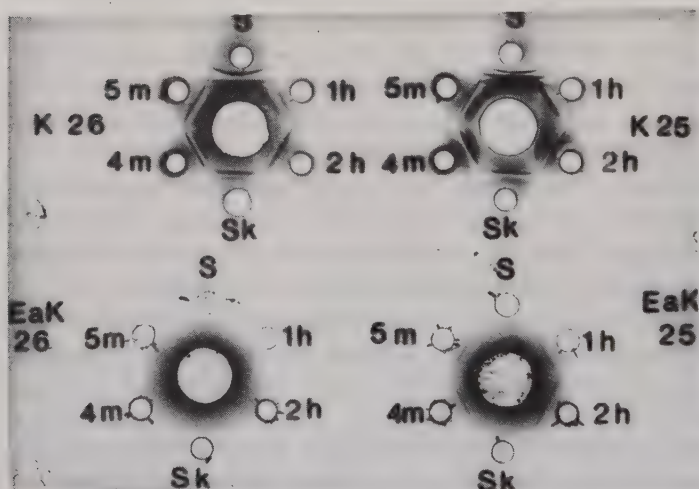


Abb. 5: Effekt der Absorption der Seren 25 und 26

Die nativen Seren K 25 und K 26 reagieren mit sämtlichen getesteten Antigenen einschließlich menschlicher Serumproteine und Hauthomogenat. Nach Absorption an Serum und Erythrozyten reagiert Eak 25 noch mit der mikrosomalen Fraktion von Tumor 5 (Pos. 5 m). Eak 26 reagiert mit Homogenaten aus Tumor 1 und 2 (h₁, h₂) und den mikrosomalen Fraktionen von Tumor 4 und 5 (4 m, 5 m). In keinem Fall fand sich nach Absorption noch eine Präzipitationslinie gegen Serumproteine oder Hauthomogenat. (Weiteres Verhalten der Seren s. Tab. 8 und 11).

K	S	Sk	Tu1 h	Tu1 u	Tu2 h	Tu2 u	Tu3 h	Tu3 u
1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2	"	"	"	"	"	"	"	"
3	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
4	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
5	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
6	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
7								
8								
9								
10								
11								
12								
13								
14								
15								
16								
17								
18								
19								
20								

K	S	Sk	Tu1 h	Tu1 u	Tu2 h	Tu2 u	Tu3 h	Tu3 u
21	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
22	"	"	"	"	"	"	"	"
23								
24								
25	▼	▼	▼	▼	▼	▼	▼	▼
26								
27								
28								
29								
30								
31								
32								

Tab. 2: Antikörper der Seren K 1 - 32

Im nativen Zustand reagieren die Seren mit zahlreichen Präzipitationslinien gegen sämtliche Antigene (s. z.B. Abb. 7). Anstelle der Kreuze, die eine positive Reaktion darstellen, wurde dieses Verhalten, das für alle Seren gilt, durch Pfeile angedeutet.

K		K		K		K	
1	64	9	64	17	32	25	64
2	128	10	32	18	32	26	16
3	64	11	256	19	128	27	256
4	32	12	32	20	128	28	16
5	32	13	128	21	32	29	32
6	32	14	8	22	128	30	256
7	1024	15	32	23	32	31	512
8	32	16	16	24	32	32	64

Tab. 3a: Hämagglutinierende Antikörper der Seren
K 1 - 32

K		K		K		K	
1	-	9	++	17	++	25	+++
2	++	10	+++	18	++	26	-
3	-	11	-	19	-	27	-
4	-	12	(+)	20	+++	28	+
5	+	13	++++	21	++	29	(+)
6	-	14	-	22	+	30	-
7	-	15	-	23	(+)	31	(+)
8	-	16	+	24	+	32	-

Tab. 3b: Lymphozytotoxische Antikörper der Seren
K 1 - 32

In nativem Zustand enthalten die Seren mittlere Titer hämagglutinierender Antikörper, die Hälfte der Seren hat zytotoxische Antikörper.

aK	S	Sk	Tu1 h	Tu1 u	Tu2 h	Tu2 u	Tu3 h	Tu3 u
1	-	-	+	+	+	+	-	+
2	-	+	+	+	+	+	+	+
3	-	+	+	+	+	+	+	+
4	-	-	-	-	+	-	-	+
5	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	+	-	-	-	+	+
7	-	+	+	++	+	+	+	+
8	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	+	-	+	+	+	+	+
10	-	-	-	(+)	-	(+)	(+)	-
11	-	-	+	+	+	+	+	-
12	-	-	-	-	+	-	(+)	-
13	-	+	+	+	+	+	+	+
14	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	+	+	-	-	+	+	+
16	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	+	(+)	(+)	+	-
18	-	+	+	+	+	+	+	+
19	-	-	+	(+)	(+)	-	-	+
20	-	+	+	+	+	+	+	+

aK	S	Sk	Tu1 h	Tu1 u	Tu2 h	Tu2 u	Tu3 h	Tu3 u
21	-	+	+	+	+	+	+	+
22	-	+	+	+	+	+	-	+
23	-	+	+	+	+	+	+	+
24	-	+	+	+	+	+	+	+
25	-	+	++	+	++	++	+	+
26	-	-	+	+	+	(+)	-	+
27	-	-	+	+	+	(+)	+	+
28	-	-	-	+	-	-	-	-
29	-	-	-	-	+	-	-	(+)
30	-	+	+	+	+	+	+	+
31	-	+	+	++	+	+	+	+
32	-	+	+	+	+	+	-	+

Tab. 4: Antikörper der Seren aK 1 - 32

Verlauf der Absorption. Nach Absorption an menschliche Serumproteine (Blutgruppe O) erfolgt eine starke Reduktion der Antikörper. Über die Hälfte der Seren enthält aber noch Antikörper gegen das Homogenat menschlicher Haut.

aK		aK		aK		aK	
1	32	9	32	17	32	25	64
2	128	10	8	18	8	26	16
3	64	11	16	19	64	27	256
4	32	12	32	20	64	28	8
5	32	13	8	21	16	29	32
6	32	14	16	22	128	30	256
7	64	15	16	23	32	31	256
8	16	16	8	24	32	32	64

Tab. 5a: Hämagglutinierende Antikörper der Seren
aK 1 - 32

aK		aK		aK		aK	
1	-	9	-	17	+	25	+++
2	++	10	+	18	+	26	-
3	-	11	(+)	19	-	27	-
4	-	12	(+)	20	++	28	(+)
5	+	13	-	21	(+)	29	(+)
6	-	14	(+)	22	-	30	-
7	-	15	-	23	-	31	-
8	-	16	-	24	-	32	-

Tab. 5b: Zytotoxische Antikörper der Seren 1 - 32
nach Absorption an Serumproteine

EaK	S	Sk	Tu1 h	Tu1 u	Tu2 h	Tu2 u	Tu3 h	Tu3 u
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	+	+	+	-	+	+
3	-	-	+	+	-	(+)	-	+
4	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	(+)	-	-	-	(+)	(+)
7	-	-	+	-	+	-	+	+
8	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	+	-	(+)	-	+	+
10	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	+	-	(+)	-	(+)	-
13	-	-	+	+	-	+	+	+
14	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	+	-	+	-	+	+
16	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	+	-	+	+	-	-
19	-	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	+	+	+	(+)	+	-

EaK	S	Sk	Tu1 h	Tu1 u	Tu2 h	Tu2 u	Tu3 h	Tu3 u
21	-	-	+	(+)	+	+	(+)	-
22	-	-	-	-	-	-	-	-
23	-	-	+	+	+	+	+	-
24	-	-	+	(+)	-	(+)	-	-
25	-	-	+	+	+	+	+	+
26	-	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)
27	-	-	+	-	+	-	+	+
28	-	-	-	-	-	-	-	-
29	-	-	-	-	-	-	-	-
30	-	-	+	+	-	+	+	+
31	-	-	+	+	+	+	+	+
32	-	-	+	-	+	-	+	-

Tab. 6: Antikörper der Seren EaK 1 - 32

Nach erschöpfender Absorption an menschliches Serum und Erythrozyten.

18 Seren zeigen noch Reaktionen gegen die Homogenate (h) und die Ultrazentrifugate (u) dreier Melanome (Tu 1, 2, 3). Antikörper gegen Serumproteine (S) und Hauthomogenat (Sk) sind nicht mehr vorhanden.

EaK		EaK		EaK		EaK	
1	4	9	4	17	2	25	4
2	4	10	4	18	4	26	4
3	4	11	2	19	2	27	4
4	4	12	4	20	2	28	4
5	4	13	4	21	2	29	2
6	4	14	2	22	4	30	2
7	16	15	4	23	4	31	4
8	2	16	2	24	4	32	4

Tab. 7a: Hämagglutinierende Antikörper der Seren EaK 1 - 32

EaK		EaK		EaK		EaK	
1	-	9	-	17	-	25	++
2	+	10	(+)	18	(+)	26	-
3	-	11	-	19	-	27	-
4	-	12	-	20	(+)	28	-
5	-	13	-	21	-	29	-
6	-	14	-	22	-	30	-
7	-	15	-	23	-	31	-
8	-	16	-	24	-	32	-

Tab. 7b: Zytotoxische Antikörper der Seren EaK 1 -32
Nach erschöpfender Absorption sind hämagglutinierende und zytotoxische Antikörper weitgehend reduziert.

EaK	Tu4 m	Tu4 m2	Tu4 m3	Tu5 m	Tu5 m1	EaK	Tu4 m	Tu4 m2	Tu4 m3	Tu5 m	Tu5 m1	EaK	Tu4 m	Tu4 m2	Tu4 m3
1	-	-	-	-	-	13	+	-	-	(+)	-	25	+	-	-
2	(+)	-	-	+	-	14	-	-	-	-	-	26	-	-	-
3	+	-	-	-	-	15	-	-	-	+	-	27	+	-	-
4	-	-	-	-	-	16	-	-	-	-	-	28	-	-	-
5	-	-	-	-	-	17	-	-	-	-	-	29	-	-	-
6	-	-	-	-	-	18	-	-	-	+	-	30	-	-	-
7	+	-	-	+	-	19	-	-	-	-	-	31	+	-	-
8	-	-	-	-	-	20	(+)	-	-	(+)	-	32	-	-	-
9	-	-	-	-	-	21	+	-	-	+	-				
10	-	-	-	-	-	22	-	-	-	-	-				
11	-	-	-	-	-	23	+	-	-	+	-				
12	-	-	-	-	-	24	-	-	-	+	-				

Tab. 8: Antikörper der Seren EaK 1 - 32 gegen mikrosomale Fraktionen der Tumoren 4 und 5

14 von 32 erschöpfend absorbierten Antiseren enthalten Antikörper gegen subzelluläre Fraktionen (m, m1 - 3) von zwei Melanomen (Tu 4 und 5).

2.2.2. Antiseren gegen Überstände ultrazentrifugierter Melanomhomogenate

Die Tatsache, daß die gegen Melanomhomogenat gerichteten Seren fast immer auch gegen die Überstände ultrazentrifugierten Melanomhomogenats reagierten, führte zu der Annahme, daß die nachgewiesenen Antigene auch in der löslichen Phase des Zellhomogenats zu finden sein müßten.

Es wurden deshalb die Überstände von zwei Tumoren zur Immunisierung verwendet.

Homogenate der Tumoren 2 und 3 wurden eine Stunde bei 100 000 x g ultrazentrifugiert. Mit den Überständen wurden je 10 Kaninchen nach dem beschriebenen Schema immunisiert. Die Seren dieser Kaninchen (K 31a - 40 gegen Tu 2; K 41 - 50 gegen Tu 3) wurden ebenso absorbiert wie die Seren K 1 - 32 und auf Antikörper gegen ein breites Spektrum von Melanomantigenen getestet.

Dabei zeigte sich, daß die Seren vor der Absorption noch eine Reihe unspezifischer Antikörper gegen sämtliche getesteten Antigene einschließlich menschliches Serum und Haut enthielten (Tab. 9). Nach Absorption an menschliche Serumproteine und Erythrozyten waren diese Antikörper entfernt. Von den 20 Seren enthielten aber noch 14 Antikörper gegen autologes und allogenes Melanomgewebe (Tab. 11). Reaktionen gegen subzelluläre Fraktionen der Tumoren 4 und 5 fanden sich in 9 von 20 Seren. Dabei hatten unter den Seren EaK 31a - 40 lediglich 3 Seren (32a, 38 und 39) Antikörper gegen den 3. Peak der Fraktion Mc-P-100 des Tumors 4, während unter den Seren EaK 41 - 50 noch 6 Seren Präzipitationslinien gegen die 3 verwendeten

Fraktionen des Tumors 4 (Mitochondrien, Mc-P-100, 3. Peak) bildeten. Kein Serum reagierte mit dem 1. Peak von Mc-P-100 des Tumors 5 (Mc-P-100 des Tu 5 konnte in diesem Versuch wegen Materialmangels nicht verwendet werden) (Tab. 12).

Es fiel auf, daß die Titer der hämagglutinierenden Antikörper der Seren K 31a - 40 deutlich niedriger waren als die der Seren K 41 - 50. Zytotoxische Antikörper waren in allen 20 Seren nicht nachweisbar. Durch die Absorption wurden die hämagglutinierenden Antikörper vollständig beseitigt (Tab. 13a und 13b). Damit waren auch mit diesen Seren tumorspezifische Antigene charakterisiert. Daß die Seren EaK 46 und 49 nach Absorption noch zwei Präzipitationslinien zeigen, könnte auf die Existenz mehrerer Antigene hinweisen, die sich aber mit den hier angewandten Methoden nicht weiter differenzieren lassen.

Daß die gegen den Tumor 3 gerichteten Seren eine ausgeprägtere Reaktivität besitzen, als die gegen Tumor 2 gerichteten Seren, mag dadurch zu erklären sein, daß von Tumor 2 nur so wenig Material vorhanden war, daß auf die letzte Boosterung verzichtet werden mußte. Es fällt auf, daß die Seren auch im nativen Zustand bereits weniger Präzipitationslinien gegen die Melanomantigene aufwiesen als es die nicht-absorbierten anti-Homogenat-Seren getan hatten. Dies spricht für eine höhere Spezifität dieser Seren.

Diese Annahme wird auch dadurch bestätigt, daß die Seren nach erschöpfender Absorption Reaktionen gegen den 3. Peak der mikrosomalen Fraktion Mc-P-100 des Tumors 4 zeigen, gegen den die Seren EaK 1 - 32 nicht reagiert hatten. Darüberhinaus reagieren die Seren EaK 43, 44, 45, 46, 49 und 50 auch mit der Mitochondrienfraktion und Mc-P-100. Wenn man berücksichtigt, daß im

K	S	Sk	Tu1 h	Tu1 u	Tu2 h	Tu2 u	Tu3 h	Tu3 u
31a	++	++	+	+	+	+	++	+
32a	+	+	+	+	+	-	+	+
33	++	++	++	+++	++	++	+	+
34	++	++	+	+	++	++	+++	+
35	++	+	+	+	++	+	+	+
36	+++	++	+	+	++	+	+	+
37	-	-	-	-	++	-	++	+
38	++	+	+	++	++	+	++	+++
39	++	+	+	+	++	+	+	+
40	+	+	+	+	+	-	+	+
41	++	++	++	+++	++	+	++	++
42	++	+++	+++	++	++	++	++	++
43	++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++
44	++	++	++	+++	+	-	+++	+++
45	+++	++++	+++	++	++	++	++	++
46	+++	+++	+++	++	++	+	++	++
47	+++	+++	++	++	++	++	+++	++
48	++	+++	+++	++	++	+	+++	+++
49	++	++	++	++	+++	++	++	++
50	+++	+++	++	++	++	-	++	++

Tab. 9: Antikörper der Seren K 31a - 50

Auch die Seren gegen Ultrafiltrate aus Melanomgewebe zeigen im nativen Zustand ein breites Spektrum von Antikörpern gegen die Tumorpräparationen menschlicher Seren und Hauthomogenat.

aK	S	Sk	Tu1 h	Tu1 u	Tu2 h	Tu2 u	Tu3 h	Tu3 u
31a	-	-	-	-	-	-	+	+
32a	-	-	+	+	+	-	+	-
33	-	-	+	++	+	-	+	+
34	-	-	-	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	+	+	-	-
36	-	-	-	-	+	+	-	-
37	-	-	-	+	+	-	+	+
38	-	-	+	++	+	-	+	++
39	-	-	+	+	+	-	+	+
40	-	-	+	+	+	-	+	+
41	-	-	+	+	+	-	+	+
42	-	-	++	+	+	-	+	+
43	-	-	++	+	++	-	+	+
44	-	-	++	+	+	+	+	+
45	-	-	++	++	+	-	++	+
46	-	-	+	+	+	-	++	+
47	-	-	+	+	+	-	+	+
48	-	-	+	+	+	-	++	+
49	-	-	+	+	+	-	+	+
50	-	-	+	+	+	-	++	++

Tab. 10: Antikörper der Seren aK 31a - 50
Nach Absorption der Seren 31a - 50 gegen mensch-
liches Serum sind keine Antikörper gegen Serum
und Hauthomogenat mehr vorhanden.

EaK	S	Sk	Tu1 h	Tu1 u	Tu2 h	Tu2 u	Tu3 h	Tu3 u
31a	-	-	-	-	-	-	-	-
32a	-	-	+	(+)	-	-	+	+
33	-	-	-	+	+	-	+	+
34	-	-	-	-	-	-	-	-
35	-	-	-	-	+	+	-	-
36	-	-	-	-	+	+	-	-
37	-	-	-	-	-	-	-	-
38	-	-	+	-	-	-	-	+
39	-	-	-	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-	-	-	-
41	-	-	+	-	+	-	-	+
42	-	-	+	-	-	-	+	(+)
43	-	-	+	+	+	-	+	(+)
44	-	-	+	+	+	-	+	-
45	-	-	+	-	+	-	-	+
46	-	-	+	-	+	-	++	+
47	-	-	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	+	-	+	-
49	-	-	++	+	+	-	++	+
50	-	-	+	+	+	-	+	+

Tab. 11: Antikörper der Seren EaK 31a - 50
Präzipitationsreaktionen nach erschöpfender Ab-
sorption. 14 von 20 Seren enthalten noch Anti-
körper gegen Melanomgewebe.

K	Tu4 mi	Tu4 m	Tu4 m3	Tu5 m1	aK	Tu4 mi	Tu4 m	Tu4 m3	Tu5 m1	EaK	Tu4 mi	Tu4 m	Tu4 m3	Tu5 m1
31a	-	-	+	-	31a	-	-	-	-	31a	-	-	-	-
32a	-	-	+	-	32a	-	+	+	-	32a	-	-	+	-
33	-	+	+	-	33	-	-	-	-	33	-	-	-	-
34	+	+	+	-	34	-	-	-	-	34	-	-	-	-
35	+	-	-	-	35	-	-	-	-	35	-	-	-	-
36	+	+	+	-	36	-	-	-	-	36	-	-	-	-
37	-	-	+	-	37	-	-	-	-	37	-	-	-	-
38	+	+	++	-	38	+	+	+	-	38	-	-	+	-
39	-	+	+	-	39	-	+	+	-	39	-	-	(+)	-
40	+	-	+	-	40	+	+	+	-	40	-	-	-	-
41	+	+	-	-	41	-	+	-	-	41	-	-	-	-
42	++	+	+	-	42	+	+	+	-	42	-	-	-	-
43	++	++	++	-	43	+	+	+	-	43	(+)	(+)	+	-
44	+	+++	+	-	44	+	+	+	-	44	+	+	(+)	-
45	++	++	++	-	45	+	+	+	-	45	+	+	+	-
46	+	+	++	-	46	+	+	+	-	46	+	+	+	-
47	+	+	+	-	47	-	+	+	-	47	-	-	-	-
48	+	-	+	-	48	-	-	-	-	48	-	-	-	-
49	+	++	+++	-	49	+	+	+	-	49	+	+	+	-
50	++	++	+	-	50	+	+	+	-	50	+	+	(+)	-

Tab. 12: Antikörper der Seren K, aK, EaK 31a - 50 gegen subzelluläre Fraktionen der Tumoren 4 und 5.
9 der 20 Seren reagieren nach vollständiger Absorption mit subzellulären Fraktionen (mi, m3, m1) der Melanome Tu4 und 5.

	K	aK	EaK		K	aK	EaK
31a	2	2	∅	41	-	-	-
32a	4	4	∅	42	32	32	2
33	32	16	∅	43	64	32	4
34	4	4	∅	44	8	8	2
35	8	8	∅	45	256	64	4
36	8	8	∅	46	128	64	4
37	8	8	∅	47	16	8	∅
38	32	32	4	48	16	8	∅
39	64	64	4	49	128	8	2
40	128	32	4	50	32	8	2

Tab. 13a: Verhalten der hämagglutinierenden Antikörper der Seren K, aK, EaK 31a - 50

	K	aK	EaK		K	aK	EaK
31a	-	-	-	41	-	-	-
32a	-	-	-	42	-	-	-
33	-	-	-	43	-	-	-
34	-	-	-	44	-	-	-
35	-	-	-	45	-	-	-
36	-	-	-	46	-	-	-
37	-	-	-	47	-	-	-
38	-	-	-	48	-	-	-
39	-	-	-	49	-	-	-
40	-	-	-	50	-	-	-

Tab. 13b: Verhalten der zytotoxischen Antikörper der Seren K, aK, EaK 31a - 50

In den gegen Ultrazentrifugate von Melanomen gerichteten Seren fanden sich keine lymphozytotoxischen Antikörper. Die hämagglutinierenden Antikörper wurden durch erschöpfende Absorption beseitigt.

2.2.3. Seren gegen mikrosomale Fraktionen menschlicher Melanomzellen

Der Nachweis einer RNA-gesteuerten DNA-Polymerase ist ein wichtiges Indiz für das Vorhandensein von Viren in Tumoren. Die umgekehrte Transkriptase hat nicht nur bei der Replikation des Virus und der Zelltransformation eine entscheidende biologische Funktion, sondern stellt zugleich ein Virusantigen dar, dessen Antigendeterminanten vorwiegend gruppen- und interspezifisch sind. Daher bieten sich neben biochemischen Nachweismethoden immunologische Tests zur Charakterisierung des Enzyms an. Dies könnte umso mehr Bedeutung haben, als von den beschriebenen biochemischen Testmethoden, mit denen sich die Aktivität einer umgekehrten Transkriptase im menschlichen Melanom zeigen ließ, nicht mit letzter Sicherheit gesagt werden kann, ob sie ausschließlich tumorspezifische Enzymaktivität nachweisen. Es besteht nämlich die Möglichkeit, daß das Enzym auch in gesunden Zellen vorhanden ist und nur wegen der geringeren Proliferationsrate normaler Zellen in wesentlich geringerer Aktivität nachweisbar ist (BIRK-MAYER 1974). Daher wurde der Versuch unternommen, Antiseren gegen definierte mikrosomale Fraktionen herzustellen, um dadurch einerseits die Spezifität der Seren zu verbessern, andererseits um die umgekehrte Transkriptase, die in diesen Fraktionen angereichert nachgewiesen werden konnte, auch immunologisch zu erfassen. Dabei wurde in Kauf genommen, mit recht geringen Mengen antigenen Materials auszukommen.

Das Melanomgewebe wurde wie unter 1.1. geschildert

aufgearbeitet, die reverse Transkriptase-Aktivität wurde bestimmt und die Proteinkonzentration in den einzelnen Peaks nach LOWRY gemessen.

Tu 4 zeigte im 2. und 3. Peak der aufgetrennten Mikrosomenfraktion die höchste Aktivität an umgekehrter Transkriptase. Aus einer Menge von ca. 500 g Tumorgewebe konnten 22,5 mg Protein im 2. Peak und 26 mg im 3. Peak gewonnen werden. Mit diesen Mengen war es möglich, je ein Kaninchen gegen die beiden Peaks zu immunisieren. Jedem Kaninchen wurden anfangs 3 mg und zur Boosterung jeweils 2 mg Protein appliziert.

Tu 5 zeigte eine recht geringe Aktivität an umgekehrter Transkriptase. Da sich im 4. und 5. Peak ausreichende Proteinmengen bestimmen ließen, wurden diese beiden Peaks zur Immunisierung eingesetzt. Es waren ebenfalls ungefähr 500 g Melanomgewebe verarbeitet worden (26,5 mg im 4. Peak; 35,5 mg im 5. Peak).

Die Seren wurden folgendermaßen beziffert:

Serum gegen Tu 4, Mc-P-100,	2. Peak	=	K 51
" " " "	3. Peak	=	K 52
" " Tu 5, "	4. Peak	=	K 55
" " " "	5. Peak	=	K 56

Die gewonnenen Antiseren wurden analog zu den vorigen Seren behandelt und vor und nach jedem Absorptionsschritt getestet.

Dabei ergab sich, daß sie in einigen Punkten anders reagierten als die gegen Homogenate gerichtete Seren.

So zeigten bereits die nativen Seren nur noch wenige und schwache Linien gegen menschliches Serum und Haut (Tab. 14) und bildeten nach der Absorption an Serumproteine keine Präzipitationslinien mehr gegen diese Kontrollantigene. Mehr und ausgeprägtere Linien fanden sich gegen die

Homogenate und Ultrazentrifugate der Tumoren 1, 2 und 3. Es waren aber weniger Linien als sie die nativen Seren K 1 - 32 gegen diese Präparationen gebildet hatten.

Nach Absorption an Serumproteine waren fast alle unspezifischen Antikörper aus den Seren verschwunden. Nach der Absorption an rote Blutzellen waren im Serum EaK 51 keine Antikörper mehr gegen Homogenate und Ultrazentrifugate nachweisbar. EaK 52 reagierte noch mit den Ultrazentrifugaten von Tu 1, 2 und 3. Dagegen besaß EaK 56 Antikörper gegen die Homogenate dieser drei Tumoren, und EaK 55 bildete nur noch eine Linie gegen Tu 1h (Tab. 18). Nach den Absorptionen waren zwar die zyto-toxischen Antikörper bis auf EaK 51 weitgehend reduziert, doch waren die ziemlich hohen Häm-Titer nur bei EaK 51 und 52 beseitigt, während bei EaK 55 und 56 noch Titer von 1:128 und 1:256 vorhanden waren (Tab. 20).

Die Reaktion gegen subzelluläre Fraktionen des Tumors 4 beschränkte sich bei dem Serum EaK 51 auf den 2. und 3. Peak der Fraktion Mc-P-100. EaK 52 zeigte keine Linien gegen Mitochondrien, Mc-P-100 und den 3. Peak. Ebenso verhielt sich EaK 56, während EaK 55 nurmehr eine sehr schwache Linie gegen den 3. Peak aufwies. Die Seren 55 und 56 konnten aus Materialgründen gegen den 2. Peak nicht mehr getestet werden.

EaK 51 und 52 reagierten mit dem 1. und 2. Peak von Mc-P-100 des Tumors 6, zeigten aber auffallenderweise keine Linie gegen irgendeine der Fraktionen des Tumors 5. EaK 55 und 56 enthielten Antikörper gegen die meisten der Peaks der Tumoren 5 und 6 (Tab. 15).

Damit schien der Bereich der Spezifität dieser Seren nach erschöpfender Absorption ausreichend abgesteckt zu sein.

	S	Sk	Tu1 h	Tu1 u	Tu2 h	Tu2 u	Tu3 h	Tu3 u
K 51	+	+	++	++	++	++	++	++
52	+	+	++	++	++	++	++	++
55	+	+	++	++	++	+	++	++
56	+	+	++	++	++	+	++	++
aK 51	-	-	-	-	+	-	(+)	-
52	-	-	-	+	-	+	-	+
55	-	-	+	+	-	-	-	-
56	-	-	+	+	+	-	+	-
EaK 51	-	-	-	-	-	-	-	-
52	-	-	-	+	-	+	-	+
55	-	-	+	-	-	-	-	-
56	-	-	+	-	+	-	+	-

Tab. 14: Antikörper der Seren K, aK und EaK 51, 52, 55, 56
Wirkung der Absorption auf die Antikörper gegen
Homogenate und Ultrazentrifugate der Melanome
Tu 1, 2 und 3. Serum EaK 51 enthält keine Anti-
körper gegen Homogenate (h) und lösliche Pro-
teine (u) der Melanome Tu 1 - 3.

	Tu4 m1	Tu4 m	Tu4 m2	Tu4 m3	Tu5 m1	Tu5 m2	Tu5 m3	Tu5 m4	Tu5 m5	Tu5 m6	Tu6 m1	Tu6 m2	Tu6 m3	Tu6 m4	Tu6 m5	Tu6 m6
K 51	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
52	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	++	++	+	+	-	+
55	+	+	nt	+	nt	+	+	+	+	nt	-	+	+	nt	nt	nt
56	++	+	nt	+	nt	+	+	+	+	nt	-	+	+	nt	nt	nt
aK 51	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
52	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	++	++	+	-	-	-
55	+	-	nt	+	-	+	+	+	+	-	-	(+)	(+)	+	-	-
56	++	+	nt	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-
EaK 51	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
55	-	-	nt	(+)	-	-	+	(+)	(+)	+	-	(+)	(+)	+	-	-
56	+	+	nt	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	(+)	-	-

Tab. 15: Antikörper der Seren K, aK und EaK 51, 52, 55, 56 gegen subzelluläre Fraktionen der Tumoren 4, 5, 6. (nt = nichtgetestet) EaK 51 reagiert mit dem 2. und 3. Peak von Melanom Tu 4 und dem 1. und 2. Peak von Melanom Tu 6.

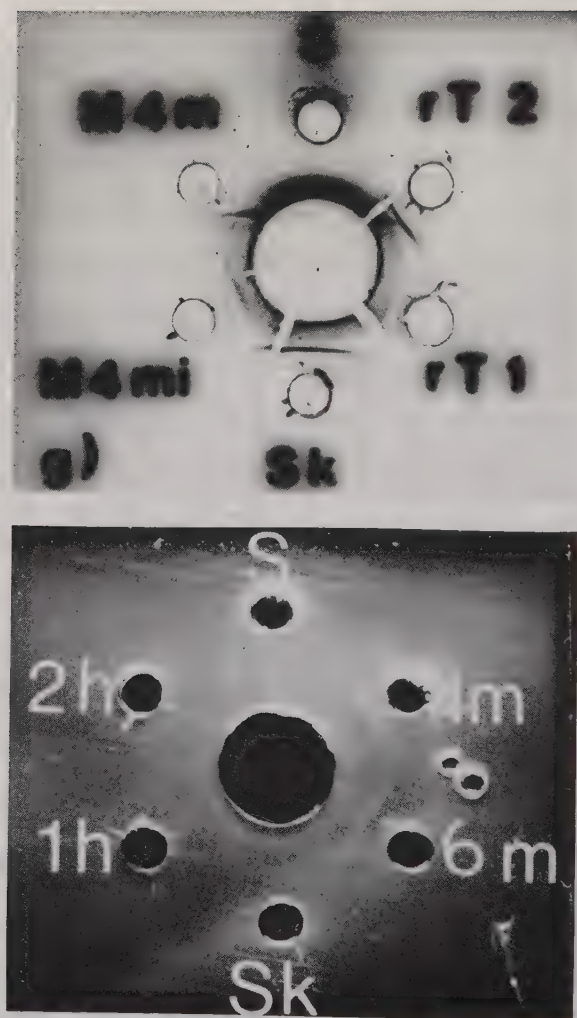


Abb. 7: Verhalten des Serums K 51 vor und nach Absorption (rT 1 = 4m2; rT 2 = 6m2; g = vor Absorption) Die obere Abbildung zeigt das Serum 51 vor der Absorption. Präzipitreaktionen gegen Serum (S) und Haut (Sk) sind vorhanden. In der unteren Abbildung sind nur noch Linien gegen die subzellulären Fraktionen mit gesteigerter Aktivität an umgekehrter Transkriptase aus den Melanomen Tu 4 und 6 (4m; 6m) nachweisbar.

	K	aK	EaK	K	aK	EaK
51	512	128	4	++++	+++	++
52	1024	512	8	+++	+	(+)
55	1024	1024	128	+++	(+)	-
56	1024	1024	256	+++	(+)	(+)

a)

b)

Tab. 16: Hämagglutinierende Antikörper und (16b) zytotoxische Antikörper der Seren K, aK, EaK 51, 52, 55, 56.

2.2.4. Hemmung der Aktivität der RNA-abhängigen DNA-Polymerase

Bei den Immundiffusionsstudien hatte sich gezeigt, daß diejenigen Seren, die durch Immunisierung mit mikrosomalen Fraktionen aus Melanomgewebe gewonnen worden waren, die höchste Spezifität besaßen. Von diesen Seren war es vor allem K 51, das nach erschöpfender Absorption nur noch gegen den Anteil der Mikrosomenfraktion gerichtet war, der zugleich die höchste Aktivität an umgekehrter Transkriptase enthielt. Es wurde deshalb angenommen, daß mit dem Serum EaK 51 die Aktivität des Enzyms spezifisch hemmbar sein müsse. Um dies zu testen, wurde das Serum zu dem Testansatz für den Nachweis der reversen Transkriptase zugegeben (s. 1.1.1). Als Kontrolle wurde der Einfluß eines anti-Menschen-IgG-Serums und eines Antiserums gegen sämtliche menschliche Serumproteine (vom Kaninchen) auf die Enzymaktivität bestimmt. Dabei ergab sich, daß das Serum EaK 51 in der Lage war, die Aktivität der umgekehrten Transkriptase um 72% zu inhibieren, während die gegen normale menschliche Proteine gerichteten Seren

einen Hemmeffekt von 12% bzw. 5% hatten (Abb. 8).

EFFECT OF DIFFERENT SERA ON THE REVERSE TRANSCRIPTASE ACTIVITY PRESENT IN HUMAN
MELANOMA

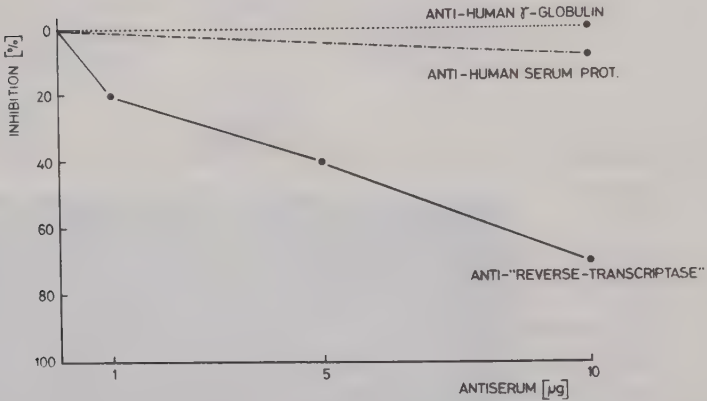


Abb. 8: Wirkung verschiedener Seren auf die Aktivität der umgekehrten Transkriptase aus menschlichem Melanom. Die punktierten Linien zeigen die Wirkung zweier Antiseren gegen unspezifische, menschliche Serumproteine (Die Abszisse gibt den Proteingehalt der Antiseren in Mikrogramm an).

2.2.5. Spezifität der Antigene

Nachdem die Spezifität der Seren weitgehend eingegrenzt war, bekam die Frage Bedeutung, wie spezifisch die verschiedenen als Antigen verwendeten Melanompräparationen waren. Da auch die subzellulären Fraktionen noch eine Reihe von normalen menschlichen Gewebeanthigenen enthielten, mußte die Tumorspezifität der gefundenen Antigene durch einen Kontrollversuch bestätigt werden.

Zu diesem Zweck wurde eine Reihe der verfügbaren Melanompräparationen gegen Antiseren getestet, die gegen normale menschliche Antigene gerichtet waren. Wie aus der Tabelle 17 ersichtlich wird, besteht ein deutlicher Unterschied in der Reaktivität der Seren gegen Tumorphomogenat und -ultrazentrifugat einerseits und den mikrosomalen Fraktionen andererseits.

Vier der Seren zeigten einen besonders weit gestreuten Reaktionsbereich: ein anti-IEP-Serum¹⁾ (Immunelektrophorese-Proteine), ein anti-Colostrum-Serum²⁾, ein gegen IgA, G und M gerichtetes Serum³⁾ sowie ein anti-IgG-Serum³⁾. Diese Seren wurden nach demselben Modus absorbiert wie die anti-Melanom-Seren, gegen Serumproteine und Erythrozyten. Das Ergebnis (Tab. 18) war eine vollständige Reduktion der Antikörper aus diesen Seren. Die absorbierten Kaninchen-anti-Melanom-Seren hatten aber gegen die verwendeten Antigene nach Absorption noch reagiert.

1) Fa. Hyland, Los Angeles, USA

2) Fa. Medac, Hamburg

3) Behring-Werke, Marburg

anti-	Tu1 h	Tu1 u	Tu2 h	Tu2 u	Tu3 h	Tu3 u	Tu4 m	Tu4 m3	Tu5 m4	Tu5 m5	Tu6 m2	Tu6 m3
IEP	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	-	(+)	++	+
alpha ₂ -Makro- globulin	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
beta ₂ -Glyko- protein I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
beta ₂ -Glyko- protein III	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
Colostrum	++++	++	++	+	++	++	+	++	-	-	+	+
IgA, G, M	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
Complement C ₃	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IgA	+	+	+	(+)	-	+	-	-	-	-	-	-
IgM	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
IgG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 17: In Antiseren gegen normale menschliche Proteine, getestet gegen verschiedene Melanompräparationen, sind präzipitierende Antikörper gegen Präparationen von Tumorgewebe vorhanden. Diese Antiseren reagieren deutlich vermindert gegen Präparationen der mikrosomalen Fraktion.

anti-	Tu1 h	Tu1 u	Tu2 h	Tu2 u	Tu3 h	Tu3 u	Tu4 m3	Tu5 m
IEP	-	-	-	-	-	-	-	-
Colostrum	-	-	-	-	-	-	-	-
IgA, G, M	-	-	-	-	-	-	-	-
IgM	-	-	-	-	-	-	-	-
anti-	Tu5 m1	Tu5 m2	Tu5 m4	Tu5 m5	Tu6 m2	Tu6 m3	Tu6 m4	Tu6 m5
IEP	-	-	-	-	-	-	-	-
Colostrum	-	-	-	-	-	-	-	-
IgA, G, M	-	-	-	-	-	-	-	-
IgM	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 18: Reaktion normaler anti-Mensch-Seren gegen Melanompräparationen nach erschöpfender Absorption. Die Seren wurden nach dem gleichen Schema absorbiert wie die gegen Melanom gerichteten. Danach zeigten sie gegen Tumorgewebe keine Reaktion mehr.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

Durch biochemische Untersuchungen können im Melanom die Aktivität einer RNA-gesteuerten DNA-Polymerase, eine charakteristische 70-S-RNA und virusähnliche Partikel nachgewiesen werden. Diese Befunde können als Indizien für das Vorhandensein von Viren im menschlichen Melanom gewertet werden.

Immunologische Untersuchungen bestätigen, daß Melanomzellen tumorspezifische Antigeneigenschaften besitzen, die in normalem menschlichen Gewebe nicht gefunden werden.

Diese Antigene können mit Hilfe xenogener Antisera nachgewiesen werden.

32 Seren von Kaninchen, die mit homogenisiertem Melanomgewebe immunisiert wurden, enthielten ein weites Spektrum von Antikörpern. Nach erschöpfender Absorption blieben in 18 von 32 Seren Antikörper zurück, die mit autologen und allogenen Melanomantigenen reagierten, nicht aber mit normalen Serumproteinen und normaler Haut. Die Seren wurden gegen fünf Melanome getestet. Ein ähnliches Ergebnis wurde gefunden, als die Überstände ultrazentrifugierten Melanomhomogenats zur Immunisierung verwendet wurden. 14 von 20 der Antisera enthielten nach der Absorption Antikörper gegen verschiedene Präparationen von fünf untersuchten Melanomen.

Gegen subzelluläre Fraktionen, in denen als Indiz viraler Aktivität RNA-gesteuerte DNA-Polymerase nachgewiesen wurde, konnten vier Seren hergestellt werden, die spezifische Antikörper gegen Präparationen von sechs Melanomen besaßen. Mit einem dieser Seren, das nur mit subzellulären Fraktionen reagierte, konnte die Enzymaktivität der umgekehrten Transkriptase konzentrationsabhängig gehemmt werden.

Kaninchen-Antiseren gegen normale menschliche Proteine enthielten nach Absorption keine Antikörper gegen die Melanompräparationen. Damit wurde weiter bestätigt, daß diese Präparationen tumorspezifische Antigene besaßen.

3. Diskussion

Das Ziel der dargestellten Experimente war ein möglichst differenziertes Studium der Antigenität des menschlichen Melanoms. Dabei sollte nicht nur bestätigt werden, daß Melanomzellen tumorspezifische Antigenstrukturen besitzen, sondern es sollten zugleich Indizien dafür gewonnen werden, daß im Melanom Viren vorhanden sind, die möglicherweise mit der Ätiologie dieses Tumors in Zusammenhang gebracht werden können.

3.1. Viren als Ursache der Zelltransformation

Das Konzept einer viralen Tumorinduktion wurde schon zu Beginn des Jahrhunderts vertreten. Von ELLERMANN und BANG wurde 1908 die Entdeckung eines filtrierbaren Agens der Hühnerleukose beschrieben. ROUS konnte 1911 ein Hühnersarkom durch zellfreie Extrakte übertragen.

Weitere Fortschritte waren die Entdeckung filtrierbarer Erreger von Kaninchen-Fibromen und -Papillomen durch SHOPE (1933), der Nachweis extrachromosomaler Heredität des Mäuse-Mammarcarcinoms (BITTNER 1936) und GROSS' zellfreie Übertragung der Mäuseleukämie (1951), die zur Entdeckung einer Fülle verschiedener neuer Mäuseleukämien Anlaß gab (FRIEND, RAUSCHER, MOLONEY 1960). Mit dem von STEWART und EDDY (1958) gefundenen Polyoma-Virus der Maus hatte man erstmals ein Virus in der Hand, das in-vitro gezüchtet und gereinigt werden konnte.

Durch den Einsatz moderner biochemischer und serologischer Methoden wurden die Vorstellungen einer virus-induzierten Tumorgenese bei Tieren zur gut fundierten Theorie erweitert. Damit bekamen auch die

Berichte über den Nachweis viraler Indizien in menschlichen Tumoren eine plausible Grundlage (BERNHARD 1970). Betroffen davon ist neben dem BURKITT'schen Lymphom, dem Mammacarcinom, der Leukämie und einigen anderen auch das Melanom. In Analogie zu Bakteriophagen werden Tumorstoffen in zwei Gruppen unterteilt, die DNA- und RNA-Viren. Zur ersten Gruppe gehört z.B. das Epstein-Barr-Virus, das als wahrscheinlicher Erreger des BURKITT-Lymphoms angesehen wird.

Indizien für die Aktivität von RNA-Viren wurden u.a. im Mammacarcinom in Leukämien, Lymphomen und im Melanom gefunden.

Es sei noch einmal betont, daß eine ätiologische Funktion dieser Viren durch ihre Existenz in den betreffenden Tumoren noch nicht bewiesen ist. Im Tierversuch kann der Beweis durch die Übertragung des Tumors mit zellfreien Extrakten geführt werden.

So ist es z.B. möglich, ein experimentelles Hamster-melanom, das FORTNER'sche A-Mel 3, durch Überimpfen einer subzellulären Fraktion zu übertragen. Dabei handelt es sich um die Fraktion, in der virale Indizien mit biochemischen Methoden gefunden werden (BIRKMAYER 1972).

Bei menschlichen Tumoren ist man auf biochemische und serologische Nachweise beschränkt, da eine zellfreie Tumorstoffübertragung selbstverständlich nicht durchführbar ist. Die tumorerzeugende Wirkung einer so gefundenen viralen Aktivität kann aufgrund eines Analogieschlusses zum Tiermodell angenommen werden. Aufgrund der gegenwärtigen Kenntnisse über RNA-Tumorstoffen hat man jedoch wichtige Kriterien ermitteln können, die zum Nachweis von onkogenen RNA-Viren erfüllt werden müssen.

3.1.1. Kriterien für den Nachweis onkogener RNA-Viren

Viren können sich nur dadurch vermehren, daß sie als Parasiten den Stoffwechsel einer Wirtszelle in Anspruch nehmen. Da ein onkogenes RNA-Virus seine genetische Information nur dann in die Zelle einschleusen und dort etablieren kann, wenn eine DNA gebildet und in die chromosomale DNA der Zelle integriert wird, ist der entscheidende Schritt nach der Virusinfektion die Verwandlung der Virus-RNA in DNA. Dieser Vorgang, der die Umkehr des Transkriptionsschrittes von DNA zu RNA bedeutet, wird dementsprechend umgekehrte Transkription genannt. Das Enzym, welches diese Reaktion katalysiert, ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die auch als umgekehrte oder reverse Transkriptase bezeichnet wird. Dieses Konzept der Biologie von onkogenen RNA-Viren wurde von TEMIN 1964 theoretisch postuliert und 1971 experimentell erarbeitet.

1. Ein wichtiges Argument für das Vorhandensein von onkogenen RNA-Viren ist daher erstens der Nachweis einer umgekehrten Transkriptase im Tumorgebe. In Arbeiten über dieses Gebiet (GALLO 1973) hat sich gezeigt, daß die bisher bekannten onkogenen RNA-Viren übereinstimmend in einem Dichtebereich von $1,16 \text{ g/cm}^3$ sedimentieren. In diesem Bereich findet sich auch das Maximum der Enzymaktivität der umgekehrten Transkriptase.

Ein weiteres Argument, das für das Vorhandensein einer umgekehrten Transkriptase spricht, ist die Empfindlichkeit der Transkriptase-Reaktion gegenüber Vorinkubation mit RNasen. Wird die Virus-RNA als Template zerstört, so kann keine DNA mehr her-

gestellt werden. Dies wird durch eine Verringerung des ^3H -Thymidin-Einbaus meßbar (SPIEGELMAN 1972). Darüberhinaus kann die Aktivität des Enzyms durch Zugabe synthetischer Polynukleotide wie poly-rA: oligo-dT oder poly-rc:oligo-dG stimuliert werden (SPIEGELMAN 1972).

2. Ein zweites Kriterium für das Vorhandensein onkogener RNA-Viren ist der Nachweis einer einsträngigen hochmolekularen RNA in der subzellulären Fraktion, in der die Viren vermutet werden. Eine derartige RNA ist charakteristisch für alle bisher bekannten onkogenen RNA-Viren. Der Nachweis gelingt (s. Abb. 2) mit dem "simultaneous-detection-test". Das Reaktionsprodukt der Transkriptasereaktion bleibt teilweise mit einer hochmolekularen Nukleinsäure verbunden, die in derselben Dichteregion sedimentiert wie die vom ROUS-Sarkom bekannte 70-S-RNA (SCHLOM & SPIEGELMAN 1972).

Auch hier verweist die Tatsache, daß eine Vorinkubation des Reaktionsansatzes mit RNasen die Radioaktivität in der hochmolekularen Region fast völlig reduziert, auf eine einsträngige hochmolekulare RNA, an die die neu synthetisierte DNA gebunden ist.

3. Ein gutes Indiz für ein onkogenes RNA-Virus liefert die molekulare Hybridisierung von markierter DNA aus menschlichen Melanomen mit polysomaler RNA, die aus menschlichen Melanomen extrahiert wurde. Wenn es ein Merkmal einer durch RNA-Viren transformierten Zellen ist, daß an den Polysomen eine der ursprünglichen Virus-RNA komplementäre m-RNA die Synthese virusspezifischer Proteine codiert, so könnte eine erfolgreiche Hybridisierung als sehr spezifischer Test betrachtet werden.

In vorläufigen Untersuchungen konnte eine derartige Hybridisierung mit polysomaler RNA aus Melanomen, nicht aber aus Haut oder Nävuszellnävus durchgeführt werden (BALDA 1974).

4. Die elektronenmikroskopische Darstellung virusähnlicher Partikel wäre allein nur ein sehr schwacher Hinweis auf vorhandene Viren. Im Zusammenhang aber mit biochemischen und immunologischen Befunden schließt er eine wichtige Lücke in der Beweiskette, nämlich auch das morphologische Substrat der molekularbiologischen Vorgänge gefunden zu haben. Die Abbildungen zeigen virusähnliche Partikel in den subzellulären Fraktionen, die auch die höchste reverse Transkriptase-Aktivität besitzen und in denen eine 70-S-RNA gefunden wird. Die Partikel haben Ähnlichkeit mit den für onkogene RNA-Viren charakteristischen C-Typ-Partikeln.
5. Neben biochemischen und elektronenmikroskopischen Parametern haben immunologische Methoden eine große Bedeutung für den Nachweis von Viren erlangt. Die Proteine der Virushülle und des Viruskerns stellen Antigene dar. Verwandte Viren haben gleiche, gruppenspezifische Antigene und können serologisch identifiziert werden.
Die umgekehrte Transkriptase hat neben ihrer Funktion bei der Replikation des Virus ebenfalls die Eigenschaften eines gruppenspezifischen Antigens.
Auf diese Fragen wird im folgenden eingegangen.

3.2. Immunologischer Teil

In der traditionellen Immunologie werden jene Ereignisse untersucht, die in einem Organismus stattfinden, wenn er sich mit Einflüssen seiner Umwelt auseinanderzusetzen hat, die von ihm aufgrund ihrer besonderen chemischen und biologischen Eigenschaften als fremd, d.h. nicht dem eigenen Selbst zugehörig, empfunden und mit einer Abwehrreaktion beantwortet werden. Bei derartigen Außenwelteinflüssen handelt es sich gewöhnlich um Mikroorganismen, fremde Proteine oder andere hochmolekulare Stoffe, die auf irgendeinem Wege in den Organismus eingedrungen sind.

Dieser Begriff von Immunologie muß um den Gedanken erweitert werden, daß das "Fremde" zunächst in dem betreffenden Organismus selbst entsteht. Bei einer Rate von ca. 10^5 Mutationen innerhalb einer geschätzten täglichen Zahl von 10^{11} - 10^{12} Mitosen (BURNET 1965; NAGEL 1971) läßt sich vorstellen, wie Tumoren entstehen könnten, wenn die mutierten Zellen sich der immunologischen Abwehr entzögen und ein Eigenleben entfalteten. So gesehen würde die Aufgabe des Immunsystems vorwiegend darin bestehen, ein zelluläres Gleichgewicht dadurch immer wieder zur Seite der gesunden Zellen hin zu verschieben, daß es potentiell maligne Zellen als fremd erkennt und eliminiert.

Demnach ist es eine wesentliche Aufgabe tumorimmunologischer Forschung, diejenigen Veränderungen in der Struktur transformierter Zellen zu beschreiben, die vom immunologischen Überwachungsapparat als fremd erkannt werden. Die Tumorimmunologie muß daher zunächst

Aussagen über die Antigenität von Tumoren machen. Ferner muß sie sich mit tumorspezifischen Immunantworten beschäftigen, die in Form humoraler und zellulärer Antikörper auftreten. Die wichtigsten diesbezüglichen Probleme sollen hier besprochen werden. Dabei ist das Melanom exemplarisch als einer der menschlichen Tumoren zu verstehen, die von besonderem immunologischen Interesse sind.

3.2.1. Antigenität von Tumoren

Maligne transformierte Zellen, die sich in unkontrolliert entartetem Wachstum zu einem Tumor verdichten, verhalten sich immunologisch gesehen wie ein Organtransplantat (NAGEL 1971; TREPEL 1971). Daher nennt man diejenigen pathologischen Veränderungen an Tumorzellen, die als antigene Strukturen den immunologischen Erkennungsprozeß vermitteln, tumorspezifische Transplantationsantigene (TSTA).

Diese Antigene sind sowohl auf der Zelloberfläche als auch im Zytoplasma repräsentiert (WARNATZ 1974). Für die Immunantwort des Tumorträgers scheinen allerdings die Veränderungen an der Membran wichtiger zu sein, wenngleich im Serum von tumortragenden Tieren und Menschen Antikörper auch gegen tumorspezifische zytoplasmatische Antigene nachweisbar sind (GÖTZ 1973). Neben den tumorspezifischen Transplantationsantigenen erweisen sich manche mit Tumoren assoziierte Antigene als sogenannte carcinoembryonale Antigene (CEA) (TREPEL 1971; CINADER 1972). Durch sie scheint sich die Tatsache zu manifestieren, daß maligne Zellen in ihren Funktionen sich reduzieren, auf den noch undifferenzierten Zustand embryonaler

Zellen sich zurückentwickeln. Dies entspricht einem Kriterium der Malignität in der allgemeinen Pathologie (GOLD 1967; ABELEV 1968; SANDRITTER 1974).

Carcinoembryonale Antigene konnten in experimentellen Tumoren von Mäusen und Ratten nachgewiesen werden, die sowohl von Viren als auch von chemischen Carcinogenen induziert worden waren (BALDWIN 1971; CINADER 1972; COGGIN 1970; DUFF 1970). Aber auch beim Menschen konnten einige gruppenspezifisch auftretende Antigene den carcinoembryonalen zugeordnet werden. Dazu gehören Tumore des Verdauungstraktes (GOLD 1967; ABELEV 1968) und des Respirationstraktes (SCHLIPKÖTER 1973). Von diesen Antigenen sollten die organspezifischen Antigene unterschieden werden, die von dem Grundgewebe stammen, von dem der Tumor einmal seinen Ausgang genommen hat (TREPEL 1971; DECKERS 1966; RAPP 1966). Sie sind allerdings im Vergleich zu den gesunden Zellen des gleichen Organs vermindert, ein Phänomen, das man als Antigendeletion bezeichnet (GÖTZ 1973).

3.2.1.1. Antigenität experimenteller Tumoren

Daß Tumore überhaupt tumorspezifische Transplantationsantigene besitzen, wurde dadurch gezeigt, daß man in syngenetischen vorimmunisierten Versuchstieren eine spezifische Immunität gegen einen transplantablen Tumor erzeugen konnte. Eine derartige Immunisierung gelang zuerst GROSS (1943), indem er zwischen genetisch identischen

Mäusen einen durch Methylcholantren erzeugten Tumor transplantierte. Der Tumor konnte den ursprünglichen Wirtstieren, denen er exstirpiert worden war, nicht wieder retransplantiert werden; sie waren offensichtlich erfolgreich immunisiert worden.

Mit der Zeit stellte sich heraus, daß die Tumorantigene hinsichtlich ihrer Spezifität unterschieden werden mußten. Die Spezifität war insbesondere davon abhängig, ob der Tumor durch chemische Carcinogene, durch Viren, Strahlen oder andere Agentien ausgelöst worden war.

Antigenität chemisch induzierter Tumoren

Nach den erwähnten Versuchen von GROSS wurde durch zahlreiche Befunde (PREHN 1968; KLEIN 1969; CINADER 1963, 1968, 1972; KOLDOVSKY 1969; GÖTZ 1972) die Ansicht erhärtet, daß die Antigenität von chemisch induzierten Tumoren streng tumorspezifisch bezogen sei. Darunter ist zu verstehen, daß jeder individuelle Tumor nur ihm spezifische Antigene besitze, die eine ebenso spezifische Immunantwort auslösen, und daß es keine Kreuzreaktionen zwischen Antikörpern gegen einzelnen Tumoren gebe. Diese Spezifität geht teilweise sogar soweit, daß Tumore, die auf demselben Tier durch das gleiche Carcinogen an zwei verschiedenen Stellen des Körpers erzeugt wurden, unterschiedliche Transplantationsantigene haben, wie es von GLOBERSON (1964) anhand eines Benzyprensarkoms gezeigt werden konnte.

Antigenität virusinduzierter Tumoren

Anders verhalten sich Tumoren, die von onkogenen Viren induziert werden. Aufgrund von immunologischen Studien mit viral erzeugten tierischen Tumoren (seien es onkogene DNA-Viren wie das Polyoma-, SV 40- und Adenovirus, oder RNA-Viren, wie das ROUS-Sarkom-Virus, das Mäuseleukämievirus u.a.) läßt sich die Regel formulieren, daß alle Tumoren, die durch das gleiche Virus erzeugt werden, unabhängig von der Tierspezies und dem Ausgangsgewebe des Tumors einige gemeinsame Antigen-spezifitäten aufweisen (HABEL 1970; NAGEL 1971). Diese Regel darf jedoch nicht verallgemeinert werden. Es wurden nämlich bei Mäuse-Mammatumoren, die vom Mammatumortumor-Virus induziert wurden, individualspezifische Tumorentigene gefunden, ebenso wie in Zellen, die durch verschiedene Stämme des Polyoma-Virus transformiert wurden (COLLINS 1974; HEPPNER 1969; MORTON 1969; VAAGE 1968, 1969).

Auf der anderen Seite konnten allgemein-spezifische Antigene in verschiedenen Tumoren nachgewiesen werden, die durch das gleiche chemische Carcinogen erzeugt worden waren (COLLINS 1974; COLNAGHI 1971; REINER 1969; TAKEDA 1966; ZBAR 1969).

(Ob diese Befunde für eine Beteiligung von Viren auch bei chemisch induzierten Tumoren sprechen, soll hier nicht erörtert werden. Die Möglichkeit sollte aber immerhin bedacht werden).

Neben den tumorspezifischen Transplantationsantigenen, die Ausdruck morphologischer Veränderung transformierter Zellen sind, finden sich in virusinduzierten Tumoren noch die strukturellen Antigene des Virus selbst. Bei den C-Typ-Viren können aufgrund der immunologischen Spezifität drei Arten von Antigenen unterschieden werden:

1. Typenspezifische Antigene, nach denen sich verschiedene Viren einer Tierart differenzieren lassen.
2. Gruppenspezifische Antigene, die verschiedene Viren einer Tierspezies gemeinsam besitzen.
3. Interspezies-spezifische Antigene, die C-Typ-Viren verschiedener Tiere gemeinsam zukommen (STRAND 1974).

Die einzelnen Virusproteine besitzen offensichtlich mehrere Antigen determinanten, die jeweils quantitativ unterschiedlichen Anteil an den genannten drei Spezifitäten haben (STRAND 1974).

So konnte am RAUSCHER-Mäuseleukämievirus und am RICKARD-Katzenleukämievirus gezeigt werden, daß ein Hauptprotein des Viruskerns und die umgekehrte Transkriptase zum größeren Teil gruppenspezifisch waren und zu etwa 5 - 30% interspeziespezifisch; nur eine kleine Fraktion war typenspezifisch (STRAND 1974).

Im Gegensatz dazu waren die Determinanten von Virus-hüllproteinen in der Hauptsache typenspezifisch, enthielten aber auch gruppenspezifische und zu einem kleineren Teil interspeziespezifische Antigene. Die Antigene der Virushülle sind mit einem Teil der Antigene der Zelloberfläche identisch (BAUER 1974), was einerseits mit ihrer Typenspezifität übereinstimmt, andererseits bestens durch die Biologie der C-Typ-RNA-Viren erklärbar ist, die während des Reifungsvorganges ihre Hülle von der Wirtszellmembran erhalten. Um diese Antigen determinanten nachzuweisen, sind hochempfindliche Methoden notwendig wie Radioimmunassay oder Immunfluoreszenz. Mit Hilfe fluoreszierender Antikörper können die typenspezifischen

Antigendeterminanten, die an der Membran und an der Virushülle auftreten, bei lebenden Zellen an der Membran, bei fixierten Zellen im Zytoplasma dargestellt werden. Es besteht aber auch die Möglichkeit, daß wie bei einigen Stämmen des ROUS-Sarkom-Virus ein Defekt in der Produktion von Viruspartikeln eingetreten ist, so daß im Zytoplasma keine Virushüllenantigene mehr nachweisbar sind (HABEL 1970; HANAFUSA 1963) und nur noch gruppen- und interspezies-spezifische Antigendeterminanten der Viruskernbestandteile vorhanden sind (HABEL 1970; KELLOFF 1966).

Das immunologische Interesse ist vorwiegend auf solche Antigene gerichtet, die in bestimmten Gruppen von Tumoren identisch nachweisbar d.h. gruppenspezifisch sind.

Die umgekehrte Transkriptase ist in diesem Sinn von besonderer Bedeutung. Sie kann biochemisch als ein Enzym charakterisiert werden, das wahrscheinlich eine entscheidende Rolle für die Replikation von RNA-Viren und die Transformation von Wirtszellen spielt. Zusätzlich hat sie die Eigenschaft eines gruppenspezifischen Antigens. Mit Hilfe spezifischer Antiseren könnte sie daher in verschiedenen Tumoren identifiziert werden.

3.2.1.2. Antigenität menschlicher Tumoren

Die Antigenität experimenteller Tiertumoren wird vorwiegend mit Hilfe von Tumortransplantationsexperimenten untersucht. Bei den spontan auftretenden menschlichen Tumoren ist man zum Nachweis

immunologischer und insbesondere spezifisch immunologischer Vorgänge in Tumorpatienten auf indirekte Methoden angewiesen. Es handelt sich dabei im wesentlichen um:

- Nachweise von humoralen und zellulären Antikörpern im Blut von Patienten gegen autologe oder allogene Tumorantigene. In einer Fülle von Befunden konnte gezeigt werden, daß bei vielen Patienten mit Mammacarcinom (BURTIN 1966; LOISILLIER 1965), Carcinom des Dickdarms (GOLD 1967), Neuroblastomen, Melanomen (HELLSTRÖM 1972; LEWIS 1973), Osteosarkomen (MORTON 1969), BURKITT-Lymphomen (KLEIN 1967) und Retikulosarkomen (FINNEY 1960) sowohl humorale als auch zelluläre Antikörper gegen autologe und z.T. auch allogene Tumorzellen oder -extrakte vorhanden waren. Derartige kreuzreagierende Antikörper geben Hinweise auf ein oder mehrere unabhängig vom Patienten vorkommende Antigene und damit auch auf eine denkbare Virusätiologie des betreffenden Tumors (Im Kapitel "Immunologische Abwehr und Tumorstadium" wird auf humorale und zelluläre Immunität näher eingegangen).
- Intrakutantests mit autologen und allogenen Tumorextrakten.

In passiven kutanen Analphylaxietests wurde gezeigt, daß aus einem Kollektiv von tumortragenden, nicht-maligne erkrankten und gesunden Personen die tumortragenden Patienten auf die intrakutane Injektion eines Extraktes, der aus einem Carcinom, einem Sarkom und einem Lymphom gepoolt war, zu 100% mit einer Kutanallergie vom Soforttyp reagierten, wenn sie keine Metastasen hatten. Patienten mit Metastasen zeigten die Sofortreaktion zu 60,4%, während die gesunden oder nicht-maligne erkrankten Kontrollpersonen sie nur zu 12,3% hatten

(TREPEL 1971; MAKARI 1967; CZAJKOWSKI 1967). Diese Befunde geben zumindest einen Hinweis darauf, daß immunologischen Vorgängen beim Tumorstadium eine ziemliche Bedeutung zukommt, wenn sie auch noch nichts über spezifische Immunreaktionen aussagen.

- Immunologische Therapieerfolge im Sinne aktiver und passiver, unspezifischer und spezifischer Immunisierungen können ebenfalls als Hinweise auf die Existenz von tumorassoziierten Antigenen gewertet werden. Dies gilt auch für Spontanremissionen von Tumoren.
- Nachweise von spezifischen Tumorantigenen mit Hilfe xenogener Antiseren.

Von dieser Möglichkeit wurde in der vorliegenden Arbeit Gebrauch gemacht.

Nachweis tumorspezifischer Antigene mit Hilfe xenogener Antiseren.

Der Versuch, mit Homogenaten menschlicher Tumoren Versuchstiere zu immunisieren und mit Hilfe der gewonnenen Antiseren nach verschiedenen Absorptionen tumorspezifische Antigene darzustellen, ist häufig unternommen worden. Vorwiegend mit Immunfluoreszenzmethoden konnten auf diese Weise Antigene nachgewiesen werden, die auf der Membran oder im Zytoplasma von Melanomzellen lokalisiert waren. So wurden tumorspezifische Antigene in Carcinomen des Verdauungs- und Respirationstraktes, in Ovarial- und Mamma-Carcinomen, Melanomen und Sarkomen und anderen bösartigen Neubildungen des Menschen gefunden (CARVALHO 1963; TEE 1965; ZILBER 1957; SCHLIPKOTER 1973).

GOODWIN (1972) immunisierte Kaninchen mit Melanomhomogenaten und fand mit der Immunfluoreszenzmethode ein vorwiegend im Zytoplasma von Melanomzellen lokalisier-
tes Antigen.

Die Antiseren reagierten nach Absorption durch Extrakte normalen menschlichen Gewebes mit vier Zelllinien von Humanmelanomen, für die sie allerdings nicht zyto-
toxisch waren. Diese Aktivität konnte nur mit Melanom-
gewebekomponenten nicht aber mit normalem Gewebe ab-
sorbiert werden. Wie LEWIS durch fluoreszierte Seren von Tumorpatienten zeigen konnte, schien es sich da-
bei um ein allgemeinspezifisches, intrazelluläres Anti-
gen zu handeln, da die Seren auch mit zytoplasmatischen Antigenen allogener Melanomzellen reagierten (s. Ab-
schnitt über "Humorale Antikörper in Tumorträgern"). Die Existenz eines immunologisch nachweisbaren Anti-
gens, das sich übereinstimmend im Zytoplasma von Me-
lanomzellen befindet, gibt einen Hinweis darauf, daß
es sich um ein virales Antigen handeln könne.

Ähnliche Ergebnisse wurden mit Antiseren erhalten, die durch Immunisierung von Primaten mit menschlichen Melanomzelllinien hergestellt wurden (METZGAR 1973). Die Seren besaßen nach Absorption eine starke Zyto-
toxizität gegen vier menschliche Melanomzelllinien. Diese Methode führte in verschiedenen Modifikationen immer wieder zur Entdeckung tumorspezifischer Antigene in menschlichen und tierischen Tumoren (GÖTZ 1973; SCHLIPKÖTER 1973; CARREL 1973; KELLEN 1963; WOLF 1972; WEINER 1972). Die gefundenen Antigene können jedoch hinsichtlich ihrer Struktur und insbesondere ihrer bio-
logischen Funktion solange nicht näher charakterisiert werden, als nicht entsprechend definierte Antigene zur Immunisierung eingesetzt werden können.

Werden zur Immunisierung Homogenate von Tumoren verwendet, so enthalten derartige Gewebepreparationen selbstverständlich noch sämtliche antigenen Strukturen einer Zelle einschließlich des den Tumor umgebenden Bindegewebes. Damit ist zu erwarten, daß die zu immunisierenden Versuchstiere den tumorspezifischen Antigenen nur in recht geringer Konzentration ausgesetzt werden. Da außerdem eine Antikörperreaktion umso stärker ist, je weniger verschiedene Antigene zur Immunisierung eingesetzt werden, muß bei Anwendung eines Gewebehomogenates damit gerechnet werden, daß spezifische Reaktionen sehr schwach ausfallen und von unspezifischen Reaktionen gleichsam überlagert werden (WOLF 1972). Schließlich kommt hinzu, daß Tumorantigene generell schwache Immunogene sind (GÖTZ 1973). Solange allerdings definierte Antigene nicht isolierbar sind, bleibt keine andere Wahl als die Verwendung von Gewebehomogenaten.

Ein weiteres methodisches Problem stellt die Absorption der Antiseren dar. Bei der Technik einer erschöpfenden Absorption besteht die Gefahr, daß nicht nur unspezifische Antikörper gegen normale Gewebantigene absorbiert werden, sondern auch spezifische Antikörper gegen Tumorantigene. Andererseits kann nach erschöpfender Absorption mit größerer Sicherheit von Spezifität gesprochen werden, wenn noch eine Antikörperreaktion nachweisbar ist. Geht es um eine qualitative Darstellung spezifischer Antigene, so kann ein möglicher Verlust von Antikörpern zugunsten ihrer Spezifität in Kauf genommen werden.

Ein anderer Weg zur Gewinnung spezifischer Antikörper bietet sich an, wenn wie im Melanom biochemische Indizien viraler Aktivität zu finden sind. Virusspezifische Proteine wie die umgekehrte Transkriptase

können aufgrund ihrer biochemischen Aktivität isoliert und als definiertes Antigen verwendet werden. Um aber die mikrosomalen Fraktionen, die das Enzym hauptsächlich enthalten, so weit zu reinigen, daß ein sauberes monospezifisches Antigen vorliegt, müssen große Mengen von Tumorgewebe vorhanden sein. Dies ist bei menschlichen Tumoren meistens nicht gegeben. Notwendigerweise müssen daher, wie in dieser Arbeit, weniger gereinigte Fraktionen zur Immunisierung eingesetzt werden. Auf Absorptionen kann dann nicht verzichtet werden.

Im Falle der umgekehrten Transkriptase wäre wegen ihrer Gruppenspezifität eine Reindarstellung besonders wünschenswert. Monospezifische Antikörper gegen das Enzym könnten zur Grundlage immundiagnostischer Maßnahmen werden (s. dazu das Kapitel über "Klinische Tumorummunologie").

Immunologische Methoden könnten auch dazu beitragen, die Rolle von RNA-Viren bei der Entstehung maligner Tumoren aufzuklären. Dies wäre möglich, wenn es z.B. gelänge, mit aktiver oder passiver Immunisierung durch virale Antigene, wie der umgekehrten Transkriptase, das Wachstum virus-induzierter Tumoren in Versuchstieren zu verhindern.

Auch die Ansicht, daß onkogene RNA-Viren verschiedener Tiergattungen verwandt seien, könnte serologisch bestätigt werden. Für das ROUS-Sarkom-Virus, das in verschiedenen Tierarten bösartige Sarkome induzieren kann, sind derartige Zusammenhänge erwiesen (SCHMIDT-RUPPIN 1964; AHLSTRÖM 1964; DEINHARDT 1966).

Aufgrund von Hybridisierungsexperimenten konnte gezeigt werden, daß virusähnliche Partikel, die aus menschlichen Leukämiezellen isoliert worden waren,

genetische Beziehungen zu Viren aus Leukämiezellen von Primaten und Mäusen besaßen (GALLO 1973).

Beim Melanom konnten solche Verhältnisse noch nicht gefunden werden.

Aufgrund morphologischer Untersuchungen (BIRK-MAYER 1972) wäre jedoch denkbar, daß Beziehungen zwischen dem menschlichen Melanom und dem Hamstermelanom A-Mel 3 bestehen.

Es sei angemerkt, daß auch für menschliche und tierische DNA-Viren immunologische Ähnlichkeiten beschrieben wurden. In Meerschweinchen konnten Antikörper gegen gruppenspezifische Antigene aus Zellen einer Hühnerleukose hergestellt werden, die durch das Herpesvirus von MAREK, einem DNA-Tumovirus, induziert wird. Diese Antikörper zeigten Kreuzreaktionen mit Antigenen verschiedener menschlicher Tumoren (MAKARI 1973).

Wenn sich serologische Beziehungen zwischen Antigenen aus menschlichen und tierischen Tumoren in der Zukunft bestätigen lassen, ergibt sich die Möglichkeit, menschliche Tumorantigene mit Antikörpern nachzuweisen, die durch Immunisierung mit tierischen Tumorantigenen produziert wurden.

3.2.2. Immunologische Abwehr und Tumorwachstum

Im vorigen Abschnitt wurde dargestellt, daß mit dem Wachstum vieler Tumoren das Auftreten tumorspezifischer Antigene verbunden ist. Obwohl diese Antigene mit einer entsprechenden Bildung von Antikörpern verbunden ist, gehören maligne Tumoren zu den häufigsten Todesursachen.

Damit stellt sich die Frage, welcher Art die Immunantwort auf Tumorantigene sei und welche Rolle sie beim Wachstum eines Tumors spiele.

Man muß sich bei dieser Frage zunächst klarmachen, daß es wahrscheinlich wesentlich mehr Tumoren geben würde, wenn ihr Entstehen nicht durch die immunologische Überwachung verhindert würde (CINADER 1972). Eine derartige These stützt sich auf zahlreiche klinische und experimentelle Befunde:

1. Die Transplantation von experimentellen Tumoren im allogenen und xenogenen System wird durch Immunsuppression der Tumorempfänger mit Antilymphozytensen, Thymektomie, radioaktiver Bestrahlung, Carcinogenen, Zytostatika oder Kombination dieser Methoden nicht nur erleichtert sondern überhaupt erst ermöglicht (KELLEN 1973; ALLISON 1970; FLOERSHEIM 1971; NAGEL 1971).
2. Unfreiwillige "Experimente" dieser Art wurden bei Patienten durchgeführt, die ein Organ eines Krebskranken transplantiert bekamen und - unter Immunsuppression stehend - selbst einen Tumor entwickelten (TURNER 1971; NAGEL 1971; ZUKOSKI 1970; WILSON 1968; MUIZNIEKS 1968; MACLEAN 1965).
3. Es besteht ein Zusammenhang zwischen immunologischen Defekten, sei es aufgrund kongenitaler oder erworbener genetischer Veränderungen (CINADER 1972; ALEXANDER 1970; NAGEL 1971; KLAST 1970; MILLER 1968), sei es als Immunschwäche des alternden Menschen (NAGEL 1971; MILLER 1968; GROSS 1965) und der Häufigkeit von Tumoren.
4. Nach Inokulation von onkogenen Viren, wie dem Yaba-Virus in Affen, dem Shope-Fibrom-Virus und dem Papillom-Virus in Kaninchen oder dem Rous-Sarkom-Virus in Hühnern wachsen zunächst Tumoren heran,

die sich dann aber nach kurzer Zeit zurückbilden und vollständig verschwinden. Dieser Vorgang ist zugleich mit Immunität gegen das Virus verbunden, es können keine weiteren Tumoren mehr angehen (CINADER 1972; ALLISON 1969).

5. Eine bemerkenswerte Anzahl von Spontanremissionen - gerade beim Melanom nicht nur von Primärtumoren, sondern auch von ausgedehnten Metastasierungen - lassen als Erklärung die Annahme immunologischer Mechanismen zu (LEWIS 1972; HELLSTRÖM 1972; EVERSON 1966; SMITHERS 1964). All diese Befunde betonen zwar die eminente Bedeutung, die der immunologischen Überwachung im Bezug auf das Tumorwachstum zukommt; sie lassen aber zugleich die Frage offen, welcher Art im Einzelnen die Mechanismen der Abwehr sind, und warum sie so häufig nicht imstande sind, die Proliferation neoplastischen Gewebes zu verhindern.

3.2.2.1. Zelluläre Antikörper in tumortragenden Organismen

Der Gedanke, daß das Tumorwachstum von immunologischen Reaktionen begleitet sei, hat auch zu einer Reihe von histologischen Untersuchungen geführt, die unter dem Aspekt angestellt wurden, ob und welche Bedeutung man der Art und dem Umfang lymphozytärer Infiltration im Tumor und seinen Randgebieten im Zusammenhang mit dem Wachstumsstadium des Tumors beimessen könne, ob mit anderen Worten das Maß der lymphozytären Infiltration von prognostischer Relevanz sein könne. Während einige Autoren in Studien über Tier- und Menschenmelanome die vermehrte Infiltration als

prognostisch günstig und als Ausdruck intakter immunologischer Tumorabwehr beurteilen, fehlende Infiltration dagegen im umgekehrten Sinn (DVORAK 1972; BURG 1972), können andere keine Korrelation zwischen Tumordinfiltration und Prognose finden (WEIDNER, HORNSTEIN 1973). Allerdings sollte in solchen Untersuchungen auch der jeweilige Zustand eines Tumors berücksichtigt werden, da eine zelluläre Reaktion, z.B. durch Tumornekrosen, verstärkt werden kann. Differenzierte histologische Untersuchungen der zellulären Infiltration können als Hinweise auf tumorimmunologische Mechanismen aufgefaßt werden (BURG 1972).

Von Interesse sind hier auch Studien, in denen Art und Anzahl der peripheren Lymphozyten in verschiedenen Tumorausbreitungsstadien untersucht werden (RUHL 1971). Dort wird gezeigt, daß mit zunehmendem Wachstum des Tumors die Zahl der mikronukleären Lymphozyten zu- und die Zahl der makronukleären Lymphozyten, die den kleinen thymusabhängigen Lymphozyten entsprechen soll (RUHL 1971), dagegen abnimmt. Ob allerdings diese Lymphozyten spezifisch zytotoxisch sind, kann nur durch in-vitro-Tests ermittelt werden. Einer der gebräuchlichsten ist der Colony-Inhibition-Test (CI-Test), bei dem Tumortargetzellen mit Lymphozyten von Tumorträgern oder Lymphozyten, die vorher in Kultur mit Tumorantigen spezifisch sensibilisiert worden waren, inkubiert werden. Als Maß der Zytotoxizität gilt die Abnahme der koloniebildenden Tumorzellen (HELLSTRÖM 1970).

Eine weitere gebräuchliche Methode ist der von TAKASUGI und KLEIN (1970) beschriebene Mikrozytotoxizitätstest. In die Targetzellen werden radio-

aktiv markierte Substanzen gegeben, die dann in das Nährmedium ausfließen, wenn die Zellen zerstört werden. Das Maß der bestimmten Radioaktivität ist der Zytotoxizität proportional. Mit dieser Methode konnten im Blut von Patienten mit verschiedenen Tumoren Lymphozyten nachgewiesen werden, die zytotoxische Aktivität gegen die eigenen Tumorzellen wie auch gegen in vitro kultivierte allogene Tumorzellen der gleichen und anderer Tumorarten zeigten.

Das Melanom gehört dabei zu den am häufigsten untersuchten Tumoren des Menschen (BALDWIN 1973, 1972; DEVRIES 1972; HELLSTRÖM 1973; BYRNE 1973; HEPPNER 1972; SEGALL 1972; COCHRAN 1972; NAGEL 1971).

Alle Autoren können in guter Übereinstimmung die Aktivität anscheinend spezifischer zytotoxischer Lymphozyten gegen autologe und allogene Melanomzellen im Blut von Melanompatienten darstellen. Ebenso kann der Verlust dieser Aktivität deutlich mit der Metastasierung des Tumors korreliert werden. Wie in zahlreichen Arbeiten von HELLSTRÖM immer wieder bestätigt, handelt es sich dabei nicht etwa um eine einfache quantitative Abnahme spezifisch sensibilisierter Lymphozyten, sondern offensichtlich um eine im Zusammenhang mit dem Ausbreitungsprozeß der Krankheit sich steigernde Aktivität blockierender Faktoren, die imstande sind, die Lymphozyten spezifisch zu inhibieren. Diese Befunde konnten noch durch die frappierende Tatsache bestätigt werden, daß Seren von Patienten, die von ihrem Tumor (Melanome, Carcinome, Lungencarcinome) geheilt worden waren, die Eigenschaft besaßen, die blockierende Aktivi-

tät anderer Seren aufzuheben, sodaß die Immunzellen ihren zytotoxischen Einfluß (in-vitro) auf die Tumorzellen wieder ausüben konnten (HELLSTRÖM 1971). (Weiteres zur "blocking activity" im Abschnitt "Immunologische Tumorabwehr und blockierende Faktoren").

3.2.2.2. Humorale Antikörper in tumortragenden Organismen

Während einige Autoren von Übersichtsarbeiten (TREPEL 1971; SCHULER 1972) der zellulären Immunität überragende Bedeutung für die immunologische Tumorabwehr zuschreiben, soll hier die Relevanz humoraler Antikörper, deren zytotoxische Eigenschaften in vielen Befunden demonstriert worden ist, etwas mehr betont werden. Freilich scheint das Problem, die Spezifität dieser Antikörper nachzuweisen, besonders kompliziert zu sein, was schon wegen der Fülle der miteinander interferierenden antigenen Strukturen verständlich ist.

Präzipitierende Antikörper konnten mit Doppeldiffusion im Agar (CZAJOWSKI 1967; LEWIS 1971, 1972; MACKENNA 1964), mit der Komplementbindungsreaktion (LEWIS 1972; FINNEY 1966; GOLD 1966; GRAHAM 1959) und mit der Immunelektrophorese (FINNEY 1969; GOLD 1967; LEWIS 1972) gefunden werden. Um die Spezifität der Antikörper zu zeigen, muß nicht nur ihre Zugehörigkeit zur Gammafraktion der Serumproteine sondern vor allem ihre Reaktivität gegen ein definiertes, spezifisches Antigen bewiesen werden. Da auch sehr differenziert aufgearbeitete Zellfraktionen immer noch normale

Gewebsproteine enthalten, sollte demonstriert werden können, daß die Seren nach Absorption mit normalen Gewebeantigenen zwar noch mit Tumorantigenen reagieren, nicht aber mit Komponenten des normalen Gewebes. Derartige Versuche führten z.B. im Fall des malignen Melanoms zum Nachweis spezifischer humoraler Antikörper im Serum von Patienten (LEWIS 1972; MORTON 1968; MUNA 1969; ROMSDAHL 1970).

Übereinstimmende Ergebnisse konnten vor allem über das Erscheinen dieser Antikörper in Korrelation zum Stadium der Tumorausbreitung erbracht werden. Nach einer Arbeit von LEWIS (1969) hatten 80% aller Patienten mit noch nicht disseminiertem Melanom komplementabhängige zytotoxische und mit Immunfluoreszenz darstellbare Antikörper gegen die eigenen Melanomzellen im Serum, die bei Patienten mit ausgedehnten Metastasen nicht mehr nachweisbar waren. Diese Ergebnisse konnten von anderen in ähnlicher Weise bestätigt werden (MORTON 1970; MUNA 1969).

Wenn auch sicher nicht alle in Patientenseren nachweisbaren Antikörper für Tumorzellen zytotoxisch sind, so konnte doch z.B. bei Melanompatienten die Zytotoxizität humoraler Antikörper erwiesen werden (LEWIS 1969).

Im Serum von Patienten mit verschiedenen Sarkomen wurden regelmäßig Antikörper der IgG- und IgM-Fraktion gefunden (CINADER 1972; EILBER 1971), von denen die IgM-Antikörper menschliche Sarkomzellen komplementabhängig lysieren konnten (WOOD 1971). (Auf die unterschiedlichen Funktionen der beiden Antikörper wird später noch näher eingegangen).

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzmethode konnte LEWIS (1972) beim Melanom zwei Arten von Antikörpern unterscheiden, von denen die eine gegen ein oder mehrere Membranantigene, die andere gegen zytoplasmatische Antigene gerichtet waren. Die gegen die Oberfläche der Tumorzellen gerichteten Antikörper waren tumorspezifisch analog zu chemisch induzierten Tumoren von Nagetieren, da sie keine Kreuzreaktion mit Melanomzellen anderer Patienten zeigten und nur mit autologen Melanomzellen absorbiert werden konnten, nicht dagegen mit Homogenaten von autologem Hautgewebe oder allogenen Melanomzellen (LEWIS 1969). Neben diesen, offenbar gegen ein Membranantigen gerichteten Antikörpern, wurde aber noch ein zweites, im Zytoplasma lokalisiertes, Antigen gefunden. Fluoreszenzmarkierte Antikörper in Patientenserum zeigten spezifische Anfärbungen im Zytoplasma fixierter Zellen (LEWIS 1972; MUNA 1969; ROMSDAHL 1970). Diese Aktivität war nicht allein auf autologe Tumorzellen bezogen, sondern auf ein für das Melanom anscheinend allgemeinspezifisches Antigen. Dieses Antigen war auch in disseminierten Melanomen nachweisbar.

Damit entstand die Frage, was zur Ausbreitung des Tumors beigetragen hatte, wenn eine Veränderung der Antigenität nicht feststellbar war. Hatten die Patienten mit metastasiertem Melanom die Fähigkeit, Antikörper zu bilden, verloren, oder waren andere Mechanismen im Spiel, die die Aussaat der Tumorzellen begünstigten? Mit dieser Frage ist die Problematik der sogenannten blockierenden Antikörper angesprochen, über die im nächsten Abschnitt berichtet wird.

3.2.2.3. Immunologische Tumorabwehr und blockierende Faktoren

Die Bedeutung tumorspezifischer, humoraler Antikörper erschöpft sich nicht in der Funktion der Tumorabwehr. Im Zusammenhang mit der Frage, warum angesichts vorhandener immunologischer Reaktivität dennoch die Tumoren wachsen, wurde das Phänomen beobachtet, daß z.B. bei Colonicarcinomen (LEWIS 1972; THOMPSON 1971) und bei Melanomen (LEWIS 1973; MORTON 1970; HELLSTRÖM 1972) die Patientenserum ihre zytotoxischen Eigenschaften verloren, wenn die Tumoren zu metastasieren begannen. Das führt einerseits zu der Frage, in welchem zeitlichen Verhältnis Antikörperbildung und Metastasierung zueinander stehen; andererseits gibt es auch zu der Hypothese Anlaß, daß im Serum nicht nur zytotoxische Antikörper zirkulieren, sondern auch Faktoren, die diese Zytotoxizität zu hemmen vermögen (HELLSTRÖM 1971). Diese Hypothese wird vor allem dann notwendig, wenn man bedenkt, daß z.B. beim Melanom die Antigenität der Tumorzellen sich nicht modifiziert, wenn die Metastasierung beginnt, und daß der Titer der zytotoxischen Antikörper im Sinne einer Autoimmunisierung zunächst sogar ansteigt (LEWIS 1972). Das Vorhandensein sogenannter "blockierender Antikörper", die auch "enhancing antibodies" genannt werden, weil sie das Tumorwachstum begünstigen, ließ sich nun dadurch demonstrieren, daß man mit Seren von Tumorpatienten, die für die autologen Tumorzellen negativ zytotoxisch waren, den positiv zytotoxischen Effekt anderer Seren spezifisch inhibieren konnte. Dabei stammten die negativen Seren

von Patienten mit Metastasen (HELLSTRÖM 1972). Umgekehrt konnte die blockierende Aktivität von Seren tumortragender Tiere aufgehoben werden, wenn die Seren tumorexcidierter Tiere mit zytotoxischer Aktivität zugegeben wurde (BALDWIN 1973). Ebenso machten Seren von Patienten, die von ihrem Tumor geheilt wurden, den blockierenden Effekt anderer Seren im allogenen System rückgängig (HELLSTRÖM 1973).

Aus den zum Teil verwirrenden und widersprüchlichen Befunden läßt sich zumindest soviel verstehen, daß es sich bei der blockierenden Aktivität um Serumfaktoren handelt, die die spezifisch zytotoxischen Lymphozyten zu hemmen vermögen. Wahrscheinlich dürfen unter diesen Faktoren nicht einfach spezifische Antikörper verstanden werden, die die Membranrezeptoren für die Lymphozyten besetzen, sondern eher zirkulierende Tumorantigene oder Antigen-Antikörper-Komplexe (BALDWIN 1973). Blockierende Faktoren enthalten offensichtlich Anteile, die der IgG-Fraktion zuzurechnen sind und unabhängig von Komplement reagieren (BALDWIN 1973; CINADER 1972; LEWIS 1972), während die zytotoxischen, humoralen Antikörper der IgM-Fraktion angehören und komplementabhängig sind (CINADER 1972; LEWIS 1972).

Die antagonistische Wirkung der "blocking activity" auf die tumorabstoßende Potenz zytotoxischer humoraler und zellulärer Antikörper in der Zirkulation von Tumorträgern gibt zugleich eine der denkbaren Antworten auf oben gestellte Frage, warum trotz vorhandener Immunkompetenz Tumoren offenbar ungehindert weiterwachsen können.

Als weitere mögliche Erklärung ist die Tatsache zu nehmen, daß Tumorantigene wahrscheinlich generell schwache Immunogene sind (NAGEL 1971). Dies wirkt sich besonders deshalb verheerend aus, weil die verzögert beginnende schwache Immunantwort einer gesteigerten Proliferationsrate des malignen Gewebes gegenübersteht, die durch eine Überschwemmung des Organismus mit Tumorantigenen zusätzlich zur sogenannten Immunparalyse führen kann, die als ein Toleranzphänomen zu deuten wäre.

Toleranz spielt auch eine Rolle bei der Übertragung von Tumoren auf neugeborene Tiere mit Hilfe onkogener Viren. Während frühzeitige Exposition des Tieres mit dem Virus Toleranz induziert und das Tumorstadium begünstigt, ist auf diesem Wege bei älteren Tieren eine Toleranzinduktion nicht mehr möglich (NAGEL 1971; TREPEL 1971). Die immunologischen Phänomene des Krebses eröffnen auch neue Möglichkeiten für die klinische Behandlung von Tumoren, die im letzten Abschnitt kurz beschrieben werden.

3.2.3. Klinische Tumorimmunologie

Obwohl sich Ansätze für eine immunologische Tumorthherapie noch weitgehend auf der Ebene des Experiments befinden, haben sie dennoch bereits bemerkenswerte Erfolge gezeitigt.

Generell sind immer zwei Arten von immunologischer Therapie denkbar, die aktive und passive Immunisierung, die jeweils in unspezifische und spezi-

fische zu unterteilen wären.

Diese Einteilung läßt sich auch auf die Tumor-Immuntherapie übertragen.

3.2.3.1. Aktive unspezifische Immunisierung

Bei dieser Therapieform wird von der Vorstellung ausgegangen, daß in einem krebskranken Organismus bereits eine Abstoßungsreaktion stattfindet, die man mit Hilfe unspezifischer immunologischer Adjuvantien stimulieren könne. Ein derartiges Adjuvans ist z.B. das Bacillus Calmette-Guérin (BCG), das gewöhnlich als Impfstoff gegen Tuberkulose verwendet wird.

Daß es wirksame Tumorabstoßungen und Wachstumsverzögerungen bei experimentellen Tumoren induzieren kann, wird in vielen Arbeiten beschrieben (BALDWIN 1973; BANSAL 1973; CURRIE 1970; MATHE 1969; PARR 1972; WOODRUFF 1966).

Daß das BCG eine Bedeutung für die Tumorabwehr beim Menschen haben könne, wurde epidemiologischen Studien entnommen, in denen es sich zeigte, daß bei tuberkulin-positiven Personen relativ seltener Tumoren auftraten als bei tuberkulin-negativen (CINADER 1972).

Es wurden demgemäß eine große Anzahl von Tumorkranken mit BCG behandelt (CHESS 1973; DE VRIES 1973; GUTTERMANN 1973; MATHE 1969; NATHANSON 1972; SCHULER 1972; SEIGLER 1972).

Als Fazit geht aus der in der Literatur dargestellten Kasuistik hervor, daß unspezifische aktive Immuntherapie dann sinnvoll und mit signifikanten

Remissionen verbunden ist, wenn der Tumor noch regional begrenzt ist, oder nach chirurgischer Therapie nur noch geringe Tumorreste übriggeblieben sind. Wenn BCG bei ausgedehnter Metastasierung angewandt wird, kann es zu einem das Tumorstadium stimulierenden Effekt kommen (BALDWIN 1973; BANSAL 1973).

3.2.3.2. Aktive spezifische Immunisierung

Das Therapieprinzip dieser Methode besteht darin, durch Impfung mit dem oder den spezifischen Tumoralantigenen eine spezifische Immunantwort zu stimulieren. Dazu können autologe oder allogene Tumorzellen, Zellfraktionen oder onkogene Viren verwendet werden. Erste Versuche dieser Art wurden 1902 mit autologem Tumorgewebe erfolglos unternommen (zit.: SCHULER 1972).

Anhand von Mäuseleukämien konnte der präventive Effekt dieser Therapie dargestellt werden, wenn den Tieren innerhalb von sechs Tagen nach Inokulation von nicht mehr als 10^5 leukämischen Zellen eine Injektion von letal bestrahlten Leukämiezellen gleicher Herkunft gegeben wurde (MATHE 1969).

Während auch bei menschlichen Leukämien mit aktiver spezifischer Immunisierung signifikante Erfolge erzielt werden konnten (MATHE 1969), waren derartige Versuche mit menschlichen osteogenen Sarkomen, Colon-Carcinomen und Lymphosarkomen nicht sonderlich erfolgreich: von 118 Patienten zeigten drei eine Remission des Tumors, von denen eine zum Zeitpunkt der Studie viereinhalb Jahre angehalten hatte, während beim zweiten Patienten kurz

darauf die Tumoren sich neu gebildet hatten und die Remission beim dritten zwei Jahre lang anhielt (NADLER, MOORE 1969).

Eine weitere Möglichkeit, die Immunabwehr spezifisch zu stimulieren, besteht darin, unter Anwendung des LANDSTEINER'schen Prinzips die schwachen Tumorantigene mit stark immunogenen xenogenen Proteinen zu koppeln. Damit konnten bei einem Plattenepithelcarcinom, einem metastasierenden Mammacarcinom und einem metastasierenden Lebercarcinom länger dauernde Remissionen erreicht werden. Zumindest war beim größten Teil der Patienten (13 von 14) ein erhöhter Titer von Antikörpern gegen den Tumor nachweisbar (TREPEL 1971; SCHULER 1972; CZAJKOVSKY 1967).

Der schlüssige Nachweis einer Virusätiologie bestimmter Tumoren würde die Möglichkeit einer prophylaktischen Impfung bieten. Wie erfolgreich derartige Impfungen sein könnten, zeigen Experimente mit tierischen Tumurviren. Wurden Tiere mit onkogenen Viren infiziert, war es nicht mehr möglich, Tumoren zu erzeugen, sei es durch Übertragung der Viren, sei es durch Inokulation von Tumorzellen (HABEL 1972, 1961; SJÖGREN 1961; WARNATZ 1974).

3.2.3.3. Passive unspezifische Immunisierung

Ob die Gabe von Gamma-Globulinen oder die Transfusion von Lymphozyten außer einem möglichen Infektionsschutz Effekte auf das Tumorwachstum habe, darf zumindestens bezweifelt werden (SCHULER 1972).

Klinische Versuche, bei denen Tumorpatienten die Lymphozyten übertragen wurden, die von ihrem jeweiligen HL-A-identischen Zwilling mittels Ductus-thoracicus Drainage gewonnen waren, hatten derart geringfügige Erfolge, daß sie vor allem auch angesichts fehlender Kontrollen vernachlässigt werden können (YONEMOTO 1970).

3.2.3.4. Passive spezifische Immunisierung

Mit der passiven Immunisierung durch spezifische Immunseren, d.h. der Verabreichung spezifischer humoraler anti-Tumor-Antikörper sind eine Reihe von Schwierigkeiten verbunden:

Für den Menschen kämen beim gegenwärtigen Stand nur xenogene Immunseren in Frage, wenn man von der Möglichkeit absieht, Seren von Patienten zu verwenden, die eine dauerhafte Spontanremission erlebt haben. Dabei wäre man allerdings auf ein recht seltenes Ereignis angewiesen.

Zur Behandlung größerer Tumormassen ist diese Therapie insbesondere dann wenig geeignet, wenn man davon ausgeht, daß die zytotoxische Wirkung humoraler Antikörper dadurch limitiert sein kann, daß alle verfügbaren Antikörper durch exzessiven Antigenüberschuß blockiert werden, und daß es wahrscheinlich gerade die entstehenden Antigen-Antikörperkomplexe sind, die das Auftreten von sogenannten "blocking factors" verursachen.

Als sinnvoll würde sich eine Therapie mit humoralen spezifischen Antikörpern aber nach der chirurgischen Entfernung größerer Tumormassen erweisen, wenn sie die Aufgabe hätte, kleinere

Restbestände von Tumorzellen einzuschmelzen, die so häufig der Ausgangspunkt neuer, schnell wachsender Metastasen nach chirurgischer Therapie sind.

Als zusätzliche Möglichkeit können Zytostatika an die Antikörper gebunden werden, die dann ihre Wirkung spezifisch an den Tumorzellen entfalten könnten.

Freilich ist eine derartige Therapie auf breiter Ebene von der Herstellung großer Mengen hochgereinigter spezifischer Antikörper-Seren abhängig.

Eine weitere Möglichkeit passiver spezifischer Immuntherapie, die auch adoptive Immuntherapie genannt wird (MATHE 1969), besteht in der Anwendung spezifisch sensibilisierter Lymphozyten. Es würden hier sowohl autologe als auch allogene und xenogene Immunozyten in Betracht kommen (TREPEL 1971).

Zumindest im Falle der alloenen und besonders der xenogenen Lymphozyten würde es aber wahrscheinlich zu einer Abstoßungsreaktion kommen, bevor die Zellen ihre zytotoxische Aktivität gegen den Tumor voll entfalten könnten (CINADER 1972). Wenn aber die Abstoßungsreaktion durch Immunsuppression unterdrückt wird, besteht die Gefahr der graft-versus-host-Reaktion (MATHE 1969). Auch wenn es bei allen damit verbundenen Schwierigkeiten gelingt, autologe Lymphozyten in Kultur zu bringen und sie dort wirksam dem Tumorentigen zu exponieren (MOORE 1970), so ist fraglich, ob es möglich wird, ausreichende Mengen von Zellen zu gewinnen. Wenn auch die angegebenen Zellzahlen, die notwendig sind, um eine

Tumorzelle wirksam zu schädigen, von 25 pro Tumorzelle (MOORE 1970) bis 250 (TREPEL 1971) schwanken, so müßten doch schon für kleinere Tumoren bereits riesige Mengen von spezifisch sensibilisierten Lymphozyten gezüchtet werden, um dauerhafte Effekte zu erzielen.

Auch diese Methode wäre demnach nur als Zusatz zu einer Therapie sinnvoll, die zunächst den Tumor weitgehend reduziert.

Die Möglichkeit, allogene und homogene Lymphozytenspender mit antigenen Tumorzellen zu immunisieren, scheidet schon deshalb allein aus, weil sie mit der Gefahr der Tumortransplantation verbunden ist.

Trotz dieser offenkundigen Schwierigkeiten gibt es eine ganze Reihe von Versuchen mit dieser in der Theorie recht attraktiven Therapie, deren Ergebnisse allerdings noch wenig Anlaß zu großen Hoffnungen geben (CURTIS 1971; GOODWIN 1973; HUMPHREY 1971; KLEMENTZ 1967; MOORE 1970; NADLER 1966; MATHE 1969; SUMNER 1960).

3.2.3.5. Klinische Möglichkeiten auf der Basis einer Virusätiologie

Nicht nur an therapeutische Maßnahmen sei hier gedacht, sondern vor allem an diagnostische Möglichkeiten. So könnte z.B. mit Hilfe von spezifischen anti-reverse-Transkriptase-Seren diagnostische Screenings ausgearbeitet werden, wie dies für die menschliche Leukämie schon geschehen ist, nachdem die Aktivität der umgekehrten Transkriptase auch in eukaryoten leukämischen

Zellen, nie aber in normalen Blutzellen nachgewiesen werden konnte (RAINER 1973; SPIEGELMAN 1972; GALLO 1970). So wäre der Grundgedanke eines solchen Screenings der, das Maß der Aktivität und Spezifität der umgekehrten Transkriptase in einem zu untersuchenden Gewebe im Vergleich zu verschiedenen Kontrollgeweben als Indikator für die Existenz oder insbesondere die Entstehung eines malignen Tumors zu nehmen. Diese Möglichkeit wird z.B. durch Berichte über die Aktivität von reverser Transkriptase im Serum einer Patientin mit Mammacarcinom angedeutet (RAINER 1973).

Auf die Möglichkeit aktiver prophylaktischer Immunisierung ist oben schon hingewiesen worden (s. 3.3.2.). Daneben wäre es auch vorstellbar, spezifische Antiseren gegen die Metastasierung einzusetzen, die ja als Folge einer Aussaat von Tumorzellen und intrazellulärem Material aus schnellwachsenden und nekrotisierenden Tumoren zu denken wäre.

Schließlich könnte man eine Kombination von zwei oder mehr spezifischen Antiseren anwenden, von denen z.B. eines gegen die reverse Transkriptase, das andere gegen ein oder mehrere TSTA der Tumorzellmembran gerichtet wäre, wobei allerdings eine blockierende Aktivität ausgeschlossen werden müßte.

Immunologische Tumorthherapie ist damit derzeit noch nicht ohne chirurgische Therapie denkbar. Einerseits ist es bisher nicht vorstellbar, größere Tumormassen anders als durch Resektion zu beseitigen, auf der anderen Seite wird durch die

Ausschwemmung von Millionen von Tumorzellen
als Folge der unumgänglichen Traumatisierung
des Tumors unter der Operation eine Metasta-
sierung "iatrogen" häufig erst eingeleitet.

4. Zusammenfassung

1. Als biochemische und zellbiologische Indizien für die Existenz von Viren im menschlichen Melanom konnten die Aktivität einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, eine für onkogene RNA-Viren charakteristische 70-S-RNA und als morphologisches Substrat virusähnliche Partikel nachgewiesen werden.
2. Insgesamt 56 Kaninchen wurden mit unterschiedlich aufgearbeiteten Fraktionen von Melanomgewebe zur Herstellung von Antiseren immunisiert. Nach Absorption wurden die Seren mit der Agar-Doppeldiffusionsmethode auf ihre Spezifität gegenüber dem Tumor untersucht.
 - a) 18 von 32 Seren, die gegen ein Melanomhomogenat gerichtet waren, reagierten nach Absorption spezifisch gegen autologes und allogenes Melanomgewebe.
 - b) 20 Kaninchen wurden mit dem Überstand ultrazentrifugierten Melanomhomogenats immunisiert. 14 der Seren enthielten spezifische Antikörper gegen mehrere Präparationen autologen und allogen Melanomgewebes von insgesamt 5 Melanomen.
 - c) Mit subzellulären Fraktionen, in denen Indizien viraler Aktivität biochemisch nachweisbar waren, wurden Antiseren erzeugt, die spezifisch gegen Melanompräparationen gerichtet waren. Mit einem der Seren, das nur Antikörper gegen die subzellulären Fraktionen besaß, konnte die Enzymaktivität der RNA-abhängigen DNA-Polymerase gehemmt werden.

- d) Antiseren gegen eine Reihe normaler menschlicher Proteine enthielten nach Absorption keine Antikörper gegen die untersuchten Melanomgewebe.
3. Die Ergebnisse zeigen, daß im menschlichen Melanom tumorspezifische Antigeneigenschaften nachweisbar sind. Sie bestätigen ferner die Annahme, daß ein Teil dieser Antigene viraler Herkunft sei. Aufgrund der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit und in Analogie zu virus-induzierten, tierischen Tumoren kann man auch beim menschlichen Melanom ein Virus als kausales Agens in Erwägung ziehen. Daraus ergeben sich diagnostische und therapeutische Möglichkeiten, die im Diskussionsteil dieser Arbeit kurz besprochen werden.

5. Literaturverzeichnis

1. ABELEV, G.J.: Production of embryonal serum alpha-globulin by hepatomas.
Cancer Res. 28, 1344 (1968)
2. AHLSTRÖM, S.G.; KATO, R.; LEVAN, A.: Rous sarcoma in chinese hamsters.
Sci. 144, 1332 (1964)
3. AMOS, H.E.; LACHMANN, P.J.: The immunological specificity of a macrophage inhibition factor.
J. Immunology 18, 269 (1970)
4. ALEXANDER, P.; FAIRLEY, G.H.: The allergic response in malignant disease.
In: GELL, P.G.H.; COOMBS, R.R.A.: Clinical aspects of immunology. Oxford 1968, S. 499
5. ALLISON, A.C.: Potentiation of viral carcinogenesis by immunosuppression.
Brit. Med. J. IV, 1970, 419
6. ALLISON, A.C.: Immune responses to virus induced tumors.
Proc. Roy. Soc. Med. 62, 956 (1969)
7. ST.-ARNEAULT, G.; NAGEL, G.; KIRKPATRICK, D.; KIRKPATRICK, R.; HOLLAND, J.G.: Melanoma in twins.
Cancer 25, 672 (1970)
8. BALDA, B.-R.: RNS-Viren als Krebsursache
DMW 98, 2452 (1973)
9. BALDA, B.R.; HEHLMANN, R.; CHO, J.R.; SPIEGELMAN, S.: Oncornavirus-like particles in human skin cancers.
Proc. Nat. Acad. Sci. 72, 3697 (1975)
10. BALDWIN, R.W.; EMBLETON, M.J.; JONES, J.S.P.; LANGMANN, M.J.S.: Cell-mediated and humoral immune reactions to human tumors.
Int. J. Cancer 12, 73 (1973)

11. BALDWIN, R.W.; PRICE, M.R.; ROBINS, R.A.: Significance of serum factors modifying cellular immune responses to growing tumors.
Br. J. Cancer 28 Supp. I, 37 (1973)
12. BALDWIN, R.W.; PIMM, M.V.: BCG immunotherapy of rat sarcoma.
Br. J. Cancer 28, 281 (1973)
13. BANSAL, S.C.; SJOGREN, H.O.: Effects of BCG on various facets of the immune response against polyoma tumors in rats.
Int. J. Cancer 11, 162 (1973)
14. BARRANCO, S.C.; DREWINKO, B.; HUMPHREY, R.M.: Differential responses by human melanoma cells to 1,3-bis-(2-chlorethyl)-1-nitrosurea and bleomycin.
Mutation Research 19, 277 (1973)
15. BARTORELLI, A.; OREFICE, S.: Studio clinico e radiologico delle localizzazioni metastatiche di melanoma maligna alla mammella.
Tumori 58, 341 (1972)
16. BAUER, H.: RNA-Viren und Tumorantigene
In: Deutscher Krebskongreß, Kongreßbericht München 1974
17. BERNHARD, W.: Über die Wahrscheinlichkeit einer Virus-ätiologie menschlicher Krebse und Leukämien.
Schw. Med. Wo. 100, 1045 (1970)
18. BERNHARD, W.; TOURNIER, P.: Infection virale inapparente de cellules de hamster décellé par la microscopie electronique.
Ann. Inst. Pasteur 107, 447 (1964)
19. BIRKMAYER, G.: Zell- und molekularbiologische Indizien für die Virusätiologie des Melanoms.
Habilitationsschrift, Universität München 1972
20. BIRKMAYER, G.; BALDA, B.-R.; MILLER, F.; BRAUN-FALCO, O.: Virus-like particles in metastases of human malignant melanoma.
Naturwissenschaften 59, 369 (1972)

21. BIRKMAYER, G.; MILLER, F.; BALDA, B.-R.: Inhibition of high molecular weight RNA synthesis in a hamster melanoma by ethidiumbromide in vivo.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chemie 353, 1749 (1972)
22. BIRKMAYER, G.; HAMMER, C.; EBERHARD, H.D.; BRENDDEL, W.: A tumorspecific antigen associated with reverse transcriptase in human melanoma.
Behring Insitute Mitteilungen 56, 107 (1975)
23. BIRKMAYER, G.; LUBITZ, W.; HAMMER, C.; EBERHARD, H.D.; TICHMANN, I.; CHAUSSY, C.; BRENDDEL, W.: Biochemical and immunological evidence for oncornavirus features in human melanoma glioblastoma and leukaemia.
In print
24. BIRKMAYER, G.; BALDA, B.-R.; MILLER, F.: Oncornavirus information in human melanoma.
Europ. J. Cancer 10, 419 (1974a)
25. BITTNER, J.J.: Some possible effects of nursing on mammary gland tumour incidence in mice.
Science 84, 162 (1936)
26. BLOOM, E.T.; FAHEY, J.L.; PETERSON, I.A.; GEERING, G.; BERNHARD, M.; TREMPER, G.: Anti-tumor activity in human serum: antibodies detecting blood-group-A-like antigen on the surface of tumor cells in culture.
Int. J. Cancer 12, 21 (1973)
27. BOMIRSKI, A.; ZAWROCKA-WRZOLKOWA, T.; PAUTSCH, F.: Electron microscopic studies on transplantable melanotic and amelanotic melanomas in hamsters.
Arch. Derm. Forsch. 246, 284 (1973)
28. BOURGOIN, J.J.: Immunologie du mélanome malin.
Ann. Inst. Pasteur 122, 789 (1972)
29. BRAUN-FALCO, O.; BURG, G.: Zur Enzym-Histochemie des malignen Melanoms. Untersuchungen an Primärtumoren und Metastasen.
Arch. Derm. Forsch. 246, 303 (1973)

30. BRODSKY, I.; BAREN, M.; KAHN, S.B.; LEWIS, G.; TELLEM, M.: Metastatic malignant melanoma from mother to fetus.
Cancer 18, 1048 (1965)
31. BRUCKNER, H.W.; MOKYR, M.B.; MITCHELL, M.S.: Effect of imidazole-4-carboxamide, 5(3,3-dimethyl-1-triazene) on immunity in patients with malignant melanoma.
Cancer Res. 34, 181 (1974)
32. BURG, G.; BRAUN-FALCO, O.: The cellular stromal reaction in malignant melanoma.
Arch. Derm. Forsch. 245, 318 (1972)
33. BURNET, T.M.: The clonal selection theory of acquired immunology.
Cambridge 1959
34. BURKITT, D.P.: Etiology of Burkitt's lymphoma, an alternative hypothesis to a vectored virus.
J. Nat. Cancer Inst. 42, 19 (1969)
35. BURTIN, P.; KLEIST, S.W.; RAPP, W.; LOISILLIER, R.F.; BONATTI, A.: Autoanticorps chez les cancéreux.
In: (GRABAR, P.; MIESCHER, P.): Immunopathology, IVth International Symposion Basel 1966
36. BYKOVSKY, A.F.; IRLIN, I.S.; ZDHANOV, U.M.: A new group of oncornaviruses.
Arch. f. d. ges. Virusforschung 45, 144 (1974)
37. BYRNE, M.; HEPPNER, G.; STOLBACH, L.; CUMMINGS, F.; MCDONOUGH, E.; CALABRESI, P.: Tumor immunity in melanoma patients as assessed by colony inhibition and microcytotoxicity methods: a preliminary report.
Nat. Cancer Inst. Monogr. 37, 3 (1973)
38. CANTABONI, A.; GRIGOLATO, P.: Unusual organelles in the Harding-Passey amelanotic melanoma cells.
J. submicr. Cytol. 4, 277 (1972)

39. CARREL, S.; THEILKAES, L.: Evidence for a tumor-associated antigen in human malignant melanoma. *Nature* 242, 609 (1973)
40. CARVALHO, S.,DE; RAND, H.J.: Antigens in human tumors revealed in suppressed rabbits rendered tolerant to normal human tissues. *Exp. Molec. Path.* 2, 32 (1963)
41. CHESS, L.; BOCK, G.; UNGARO, P.C.; BUCHHOLZ, D.H.; MARDINEY, M.R.: Immunologic effects of BCG in patients with malignant melanoma: specific evidence for stimulation of the "secondary" immune response. *J. Nat. Cancer Inst.* 51, 57 (1973)
42. CINADER, B.: The future of tumor immunology. *Med. Clin. North America* 56, 801 (1972)
43. CLARK, D.A.; NECHELES, T.; NATHANSON, L.; SILVERMANN, E.: Apparent HL-A.5 deficiency in malignant melanoma. *Transplantation* 15, 326 (1973)
44. COCHRAN, A.J.; JEHN, V.W.; GOTOSKA, B.P.: Cell-mediated immunity to malignant melanoma. *Lancet* 1972 I, 1340
45. COCHRAN, A.J.; DIEHL, V.; STJERNSWARD, J.: Regression of primary malignant melanoma with a good prognosis despite metastasis to lymph nodes. *Rev. Europ. Etudes Clin. et Biol.* 1970 XV, 969
46. COCHRAN, A.J.: Method of assessing prognosis in patients with malignant melanoma. *Lancet* 1968 IV, 1062
47. COCHRAN, A.J.: Malignant melanoma. *Cancer* 23, 1190 (1969)
48. COGGIN, J.H.; AMBROSE, K.R.; ANDERSON, N.G.: Fetal antigen capable of inducing transplantation immunity against SV 40 hamster tumor cells. *J. Immunol.* 105, 524 (1970)

49. COHEN, S.M.; GREENSPAN, E.M.; WEINER, M.J.;
KABAKOW, B.: Triple combination chemotherapy of
disseminated melanoma.
Cancer 29, 1489 (1972)
50. COLLINS, J.J.; BLACK, P.H.: The SV 40 "S" antigen and
other papovavirus induced antigens.
In: Current Topics in Microbiology 63, 153 (1974)
51. COOPER, H.L.: Lymphocyte stimulation in malignant
melanoma.
New England J. Med. 283, 369 (1970)
52. COLNAGHI, M.J.; MENHARD, S.; PORTA, G.D.: Demonstration
of cellular immunity against urethran-induced lung
adenomas of mice.
J. Nat. Cancer Inst. 47, 1325 (1971)
53. COPEMAN, P.W.M.; LEWIS, M.G.; PHILLIPS, T.M.; ELLIOTT,
P.G.: Immunological associations of the halo naevus
with cutaneous malignant melanoma.
Br. J. Derm. 88, 127 (1973)
54. COSTA, J.; ROSAI, J.; PHILPOTT, G.W.: Pigmentation of
amelanotic melanoma in culture.
Arch. Path. 95, 371 (1973)
55. CURRIE, G.A.; LEJEUNE, F.; HAMILTON FAIRLEY, G.:
Immunization with irradiated tumor cells and specific
lymphocyte cytotoxicity in malignant melanoma.
Br. Med. J. 1971 II, 305
56. CURTIS, J.E.: Inhibiting effects of injection of
C. parvum on the growth of tumor transplantation in
isogeneic hosts.
Br. J. Cancer 20, 345 (1966)
57. CZAJKOVSKY, N.P.; ROSENBLATT, M.; WOLF, P.L.;
VASQUEZ, J.: A new method of active immunisation to
autologous human tumor tissue.
Lancet 1967 II, 905

58. DAVIS, N.C.; HERRON, J.J.; MCLEOD, C.R.: Malignant melanoma in Queensland. Analysis of 400 skin lesions. Lancet 1966 III, 407
59. DECKERS, C.: Les antigènes spécifiques de tumeurs chez le rat.
In: (GRABAR, P.; MIESCHER, P.): Immunopathology, IVth International Symposion. Basel 1966
60. DECOSSE, J.J.; MCNEER, G.: Superficial melanoma. A clinical study.
Arch. Surg. 99, 531 (1969)
61. DEINHARDT, F.: Neoplasmas induced by Rous sarcoma virus in new world monkeys.
Nature 210, 443 (1966)
62. DEPETRIS, S.; HARVEY, J.J.: Presence of unusual virus particles in two hamster tumor tissue culture cell lines induced by murine sarcoma virus.
J. Gen. Virol. 5, 561 (1969)
63. DUFF, R.; RAPP, F.: Reaction from serum of pregnant hamsters with surface of cells transformed by SV 40.
J. Immunol. 105, 521 (1970)
64. DVORAK, R.; JÄNNER, M.; ECKARDT, U.: Veränderungen der Ultrastruktur menschlicher Geschwülste durch Übertragung auf Labortiere (Melanom malignom).
Arch. Derm. Forsch. 246, 383 (1973)
65. DVORAK, R.; ECKARDT, U.: Ultrastrukturveränderungen des Harding-Passey-Melanoms durch Übertragung auf xenogene Wirte. I. Tumorimplantation in die vordere Augenkammer von Ratten und Meerschweinchen. II. Auftreten von zahlreichen virusähnlichen Partikeln und aberranten Melanosomen in immunologisch ungestimmten jungen Ratten.
Arch. Derm. Forsch. 245, 1 (1972)

66. EILBER, F.R.; MORTON, D.L. : Impaired immunological reactivity and recurrence following cancer surgery. *Cancer* 25, 362 (1970)
67. ELLERMANN, V.; BANG, O.: Experimentelle Leukämie bei Hühnern.
Centralbl. f. Bakt. Abt. I (Orig.) 46, 595 (1908)
68. EPSTEIN, W.L.; FUKUYAMA, K.; BENN, M.: Transmission of a melanoma in golden hamsters by a cell-free ultrafiltrate.
Nature 219, 979 (1968)
69. EVANS, R.; ALEXANDER, P.: Cooperation of immune lymphoid cells with macrophages in tumor immunity.
Nature 228, 620 (1970)
70. EVANS, R.; ALEXANDER, P.: Rendering macrophages specifically cytotoxic by a factor released from immune lymphoid cells.
Transplantation 12, 227 (1971)
71. EVERSON, T.C.; COLE, W.H.: Spontaneous regression of cancer.
Philadelphia 1966
72. FASS, L.; ZIEGLER, J.L.; HERBERMAN, R.B.; KIRYABWIRE, J.W.M.: Cutaneous hypersensitivity reactions to autologous extracts of malignant melanoma cells.
Lancet 1970 I, 116
73. FENN, M.E.; ABELL, M.R.: Melanomas of vulva and vagina.
Obst. Gyn. 41, 902 (1973)
74. FINNEY, J.W.; BYERS, E.H.; WILSON, R.H.: Studies in tumor auto-immunity.
Cancer Res. 20, 351 (1960)
75. FLOERSHEIM, G.L.: Transplantationsbiologie.
Berlin, Heidelberg, New York 1971

76. FOSSATI, G.; COLNAGHI, M.J.; DELLA PORTA, G.; CASCINELLI, N.; VERONESI, U.: Cellular and humoral immunity against human malignant melanoma.
Int. J. Cancer 8, 344 (1971)
77. FRESE, K.: Virus-like particles in metastasis of oral melanomas in dogs.
Naturwissenschaften 60, 55 (1973)
78. FRIEDERICH, H.C.: Melanosis circumscripta praeblastomatosia Dubreuilh.
Dt. Ä. 17, 1237 (1971)
79. FRIEND, C.: Cell-free transmission in adult Swiss mice of a disease having the character of a leucemia.
J. Exp. Med. 109, 307 (1957)
80. GALLO, R.C.: Reverse transcriptase and neoplasia.
Biomedicine 18, 446 (1973)
81. GALLO, R.C.; MILLER, N.R.; SAXINGER, W.C.; GILLESPIE, D.: Primate RNA tumour virus-like DNA synthesized endogenously by RNA dependent DNA polymerase in virus-like particles from fresh human acute leukaemic blood cells.
Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 3219 (1973)
82. GARAPIN, A.C.; MCDONELL, J.P.; LEVINSON, W.; QUINTRELL, N.; FANSHIER, L.; BISHOP, J.M.: Desoxyribonucleic acid polymerase associated with Rous sarcoma virus and avian myeloblastosis virus: properties of the enzyme and its products.
J. Virol. 6, 589 (1970)
83. GERBER, P.: Is Epstein-Barr-virus a human tumor virus?
Nat. Cancer Inst. Monogr. 36, 65 (1973)
84. GLOBERSON, A.; FELDMAN, M.: Antigenic specificity of benzopyreninduced sarcomas.
J. Nat. Cancer Inst. 32, 1229 (1964)
85. GOLD, P.: Circulating antibodies against carcinoembryonic antigens of human digestive system.
Cancer 20, 1663 (1967)

86. GOLDSMITH, H.S.; SHAH, J.P.; KIM, D.H.: Prognostic significance of lymph node dissection in the treatment of malignant melanoma.
Cancer 26, 606 (1970)
87. GOODWIN, D.P.; HORNUNG, M.O.; KREMENTZ, E.T.: Extraction and use of melanoma-associated protein for immunotherapy.
Oncology 27, 258 (1973)
88. GOODWIN, D.P.; HORNUNG, M.O.; LEONG, S.P.L.; KREMENTZ, E.P.: Immune responses induced by human malignant melanoma in the rabbit.
Surgery 72, 737 (1972)
89. GÖTZ, H.: Wesen und klinische Bedeutung der Tumorimmunologie.
Med. Klin. 68, 1217 (1973)
90. GÖTZ, H.: Antigenität von Tumorproteinen
Berlin 1972
91. GRAHAM, J.B.; GRAHAM, R.M.: The effect of vaccine on cancer patients.
Surg. Gyn. Abstr. 109, 131 (1959)
92. GROSS, L.: "Spontaneous" leukemia developing in CH₃ mice following inoculation infancy, with AK leukemia extracts, or AK embryos.
Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 76, 27 (1951)
93. GROSS, L.: Oncogenic viruses.
New York 1961
94. GROSS, L.: Immunological defect in aged population and its relationship to cancer.
Cancer 18, 201 (1965)
95. GROSS, L.; FELDMANN, D.G.: Electron microscopic studies of radiation-induced leukaemia in mice: virus release following total-body x-ray irradiation.
Cancer Res. 28, 1677 (1968)

96. GUTTERMAN, J.U.; MCBRIDE, C.; FREIREICH, E.J.;
MAVLIGIT, G.; FREI, E.; HERSH, E.M.: Active immuno-
therapy with BCG for recurrent malignant melanoma.
Lancet 1973 II, 1208
97. HAAPALA, D.K.; JASMIN, C.; SINOUSSE, F.; CHERMANN,
J.C.; RAYNAUD, M.: Inhibition of tumor virus RNA-
dependent DNA polymerase by the heteropolyanion,
silicotungstate.
Biomedicine 19, 7 (1973)
98. HABEL, K.: Virus-induced tumor antigens.
In: Current Topics in Microbiology 41, 87 (1970)
99. HAMILTON-FAIRLEY, G.: Evidence for antigenicity in
human tumors with reference to both melanoma and
acute leukemia.
Br. Med. J. 1970 IV, 483
100. HANAFUSA, H.; HANAFUSA, T.; RUBIN, H.: The defectiv-
ness of Rous sarcoma virus.
Proc. Nat. Acad. Sci. 49, 572 (1963)
101. HARDMEIER, T.: Das maligne Melanom: histologische
Befunde und deren Bedeutung für die Prognosestellung.
Schweiz. Med. Wschr. 100, 967 (1970)
102. HARRIS, J.R.; PRICE, M.R.; BALDWIN, R.W.: The puri-
fication of membrane-associated tumor antigens by
preperative polyacrylamid gel electrophoresis.
Biochimica et Biophysica Acta 311, 600 (1973)
103. HAUSEN, H.: Die Rolle von Viren bei Tumorerkrankungen.
Dt. Äbl. 47, 3251 (1973)
104. HEHLMANN, R.: Virusgenese der menschlichen Leukämien.
Dt. Äbl. 31, 2329 (1974)
105. HELLSTRÖM, I.; HELLSTRÖM, K.E.: Some recent studies
on cellular immunity to human melanomas.
Fed. Proc. 32, 156 (1973)
106. HELLSTRÖM, K.E.; HELLSTRÖM, I.: Immunity to neuroblasto-
mas and melanomas.
Ann. Rev. Med. 23, 19 (1972)

107. HELLSTRÖM, I.; HELLSTRÖM, K.E.; SJÖGREN, H.O.;
WARNER, G.A.: Serum factors in tumor-free patients
cancelling the blocking of cell-mediated tumor
immunity.
Int. J. Cancer 8, 185 (1971)
108. HELLSTRÖM, I.; WARNER, G.A.; HELLSTRÖM, K.E.;
SJÖGREN, H.O.: Sequential studies on cell-mediated
tumor immunity and blocking serum activity in ten
patients with malignant melanoma.
Int. J. Cancer 11, 280 (1973)
109. HEPPNER, G.H.; STOLBACH, L.; BIRNE, M.; CUMMINGS, F.J.;
MCDONOUGH, E.; CALABRESI, P.: Cell-mediated and serum
blocking reactivity to tumor antigens in patients
with malignant melanoma.
Int. J. Cancer 11, 245 (1973)
110. HERNANDEZ, F.J.: Malignant blue nevus. A light and
electron microscopic study.
Arch. Derm. 107, 741 (1973)
111. HOLTERMANN, O.A.; KLEIN, E.; CASALE, P.G.: Selective
cytotoxicity of peritoneal leucocytes for neoplastic
cells.
Cellular Imm. 9, 339 (1973)
112. HORNSTEIN, O.P.; WEIDNER, F.: Untersuchungen zur
prognostischen Bedeutung der Sarcomareaktion beim
malignen Melanom. I. Vascularisation und Prognose.
Virchows Arch. Path. Anat. 359, 67 (1973)
113. HORNUNG, M.O.: Growth inhibition of human melanoma
cells by C-reactive protein (CRP) activated lympho-
cytes.
Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 139, 1166 (1972)
114. HUMPHREY, L.J.; JEWELL, W.R.; MURRAY, D.P.; GRIFFEN,
W.O.: Immunotherapy for the patient with cancer.
Ann. Surg. 173, 47 (1971)

115. HUNTER-CRAIG, I.; NEWTON, K.A.; WESTBURY, G.;
LACEY, B.W.: Use of vaccinia virus in the treatment
of metastatic malignant melanoma.
Br. Med. J. 1970 II, 512
116. IHLE, J.N.; YURCONIC, M.; HANNA, M.G.: Autogenous
immunity to endogenous RNA tumor virus.
J. Exp. Med. 138, 194 (1973)
117. IKONOPISOV, R.L.; LEWIS, M.G.; HUNTER-CRAIG, I.;
BODENHAM, D.C.; PHILLIPS, T.M.; COOLING, C.I.;
PROCTOR, J.; HAMILTON-FAIRLEY, G.; ALEXANDER, P.:
Autoimmunization with irradiated tumor cells in
human malignant melanoma.
Br. Med. J. 1970 II, 752
118. ILLIG, L.; PAUL, E.: Grundsätzliches zur Klinik und
Histologie des malignen Melanoms.
Med. Welt 25, 1017 (1974)
119. JEHN, U.W.; NATHANSON, L.; SCHWARTZ, R.S.; SKINNER,
M.: In vitro lymphocyte stimulation by a soluble anti-
gen from malignant melanoma.
New Engl. J. Med. 283, 329 (1970)
120. JEREMY, D.; FARNSWORTH, R.H.; ROBERTSON, M.R.;
ANNETTS, D.L.; MURNAGHAN, G.F.: Transplantation of
malignant melanoma with cadaver kidney.
Transplantation 13, 619 (1972)
121. KABAT, E.; MAYER, M.: Experimental Immunochemistry.
Springfield 1961
122. KAHN, L.B.; DONALDSON, R.C.: Multiple primary mela-
noma.
Cancer 25, 1162 (1970)
123. KÄSER, H.; TÜRLE, K.; OTT, F.: Biochemische Unter-
suchungen beim malignen Melanom.
Schweiz. Med. Wschr. 100, 960 (1970)

124. KELLEN, J.A.; LO, J.S.: Localization of ^{125}J labelled antibodies against tumor-associated proteins from experimental rat mammary neoplasms.
Res. Comm. Chem. Path. Pharm. 5, 411 (1973)
125. KELLOFF, G.: Localization of avian tumor virus group-specific antigen in cell and virus.
Virology 29, 377 (1966)
126. KELLOFF, G.; HUEBNER, R.J.; NAM HO CHANG; YONG KI LEE ; GILDEN, R.V.: Envelope antigene relationship among three hamster specific sarcoma virus and a hamster specific helper virus.
J. Gen. Virol. 9, 19 (1970b)
127. MCKENNA, J.M.; SANDERSON, R.P.; BLAKEMORE, W.S.: Studies of antigens of human tumors. I. Demonstration of a soluble specific antigen in HeLa cells and some human tumours.
Cancer Res. 24, 754 (1964)
128. KISSMEYER-NIELSEN, F.; KJERBY, K.E.: Lymphocytotoxic microtechnique purification of lymphocytes by flotation.
In: "Histocompatibility" Copenhagen 1967
129. KLEIN, G.: Experimental studies in tumor immunology.
Fed. Proc. 28, 1739 (1969)
130. KLEIN, G.; CLIFFORD, P.; KLEIN, E.; STJÄRNSWÄRD, J.: Search for tumor specific immune reactions in Burkitt-lymphoma patients by the immunofluorescence reaction.
In: BURCHENAL, J.H.; BURKITT, D.P.: Treatment of Burkitts tumor. Berlin 1967
131. KOBAYASHI, H.; KUZUMAKI, N.; GOTODHA, E.; TAKEICHI, N.; SENDO, F.; HOSOKAWA, M.; KODAMA, T.: Specific antigenicity of tumors and immunological tolerance in the rat induced by Friend, Gross and Rauscher viruses.
Cancer Res. 33, 1598 (1973)

132. KOLDOVSKY, P.: Tumor specific transplantation antigens.
Berlin 1969
133. KONDO, S.: Phosphorylation in mitochondria from
malignant melanoma.
Arch. Derm. 107, 583 (1973)
134. KOPF, A.W.: Host defenses against malignant melanoma.
Hospital Practice 1971
135. KREMENTZ, E.T.; SAMUELS, M.S.: Tumor cross transplan-
tation and cross transfusion in the treatment of
advanced malignant disease.
Bull. Tulane U. Med. Faculty 26, 263 (1967)
136. KREMENTZ, E.T.; RYAN, R.F. Chemotherapy of melanoma
of the eytremities by perfusion. Fourteen years
clinical experience.
Ann. Surg. 175, 901 (1972)
137. LEWIS, M.G.: Immunology and the melanomas.
In: Current Topics in Microbiology 63, 49 (1974)
138. LEWIS, M.G.: Circulating humoral antibodies in
cancer.
Med. Clin. North Am. 56, 481 (1972)
139. LEWIS, M.G.; KIRYABWIRE, W.M.: Aspects of behaviour
and natural history of malignant melanoma in Uganda.
Cancer 21, 876 (1968)
140. LEWIS, M.G.; PHILLIPS, T.M.; COOK, K.B.; BLAKE, J.:
Possible explanation for loss of detectable anti-
body in patients with disseminated melanoma.
Nature 232, 52 (1971)
141. LEWIS, M.G.: Possible immunological factors in human
malignant melanoma in Uganda.
Lancet 1967 III, 921
142. LEWIS, M.G.; PHILLIPS, T.M.: The specificity of
surface membrane immunofluorescence in human malignant
melanoma.
Int. J. Cancer 10, 105 (1972)

143. LEWIS, M.G.; IKONOPISOV, R.L.; NAIRN, R.C.; PHILLIPS, T.M.; HAMILTON-FAIRLEY, G.; BODENHAM, D.C.; ALEXANDER, P.: Tumor-specific antibodies in human malignant melanomas.
Br. Med. J. 1969 III, 547
144. LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.C.; RANDALL, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagents.
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)
145. LUCE, J.K.: Chemotherapy of malignant melanoma.
Cancer 30, 1604 (1972)
146. LYNCH, H.T.; ANDERSON, D.E.; KRUSH, A.J.: Heredity and intraocular malignant melanoma.
Cancer 21, 119 (1968)
147. MACKIE, R.M.; CARFRAE, E.M.; COCHRAN, A.J.: Assessment of prognosis in malignant melanome.
Lancet 1972 II, 601
148. MAKARI, J.G.; HAYTON, T.: The tumor skin test: a five year follow-up study.
Trans. N.Y. Acad. Sci. Ser. II 28, 198 (1965)
149. MAKARI, J.G.: Association between Marek's Herpes virus and human cancer. I, II.
Oncology 28, 164 (1973)
150. MATHE, G.: Approaches to the immunological treatment of cancer in man.
Br. Med. J. 1969 IV, 7
151. MATHE, G.; POUILLART, P.; LAPEYFRAQUE, R.: Active immunotherapy of L 1210 leukemia applied after the graft of tumor cells.
Br. J. Cancer 23, 814 (1969)
152. METZGAR, R.S.; BERGOC, P.M.; MORENO, M.A.; SEIGLER, H.F.: Melanoma-specific antibodies produced in monkeys by immunisation with irradiated human melanoma cell lines.
J. Nat. Cancer Inst. 50, 1065 (1973)

153. MILLER, D.G.: The immunologic capability of patients with lymphoma.
Cancer Res. 28, 1441 (1968)
154. MOHR, U.; ALTHOFF, J.; KINZEL, V.; SÜSS, R.; VOLM, M.: Melanoma regression induced by "chalone": a new tumor inhibiting principle acting in vivo.
Nature 220, 138 (1968)
155. MOLONEY, J.B.: Biological studies on a lymphoid leukaemia virus extracted from sarcoma 37. I. Origins and intraductory investigations.
J. Nat. Cancer Inst. 24, 933 (1960)
156. MOORE, G.E.; GERNER, R.E.: Cancer immunity-hypothesis and clinical trial of lymphocytotherapy for malignant disease.
Ann. Surg. 172, 733 (1970)
157. MOORE, G.E.; GERNER, R.E.: Malignant melanoma.
Surg. Gyn. Obst. 132, 427 (1971)
158. MORTON, D.L.; MALMGREN, R.A.; HOLMES, E.C.; KETCHAM, A.S.: Demonstration of antibodies against human malignant melanoma by immunofluorescence.
Surg. 64, 233 (1968)
159. MORTON, D.L.; EILBER, F.R.; MALMGREN, R.A.; WOOD, W.C.: Immunological factors which influence response to immunotherapy in malignant melanoma.
Surgery 68, 158 (1970)
160. MORTON, D.L.; EILBER, F.R.; JOSEPH, W.L.; WOOD, W.C.; TRAHAN, E.; KETCHAM, A.S.: Immunological factors in human sarcomas and melanomas: a rational basis for immunotherapy.
161. MUNA, N.M.; MARCUS, S.; SMART, C.: Detection by immunofluorescence of antibodies specific for human malignant melanoma cells.
Cancer 23, 88 (1969)

162. NADLER, S.H.; MOORE, G.E.: Immunotherapy of malignant disease.
Arch. Surg. 99, 376 (1969)
163. NADLER, S.H.; MOORE, G.E.: Clinical immunologic study of malignant disease: response to tumor transplants and transfer of leucocytes.
Ann. Surg. 164, 482 (1966)
164. NAGEL, G.A.; GEIGER, C.: Krebs und Immunität.
Schweiz. Med. Wschr. 101, 1605 (1971)
165. NAGEL, G.A.; PIESSENS, W.F.; STILMANT, M.M.; LEJEUNE, F.: Evidence for tumor-specific immunity in human malignant melanoma.
Europ. J. Cancer 7, 41 (1971)
166. NATHANSON, L.; JEHN, U.; SCHWARTZ, R.S.: Disappearance of a tumor-associated antigen in malignant melanoma after imidazole carboxamide therapy.
Cancer 27, 411 (1971)
167. NATHANSON, L.: Regression of intradermal malignant melanoma after intralesional injection of mycobacterium bovis strain BCG.
Cancer Chemother. 56, 659 (1972)
168. (o.A.): Treatment of malignant melanoma.
Br. Med. J. 1973 I, 307
169. (o.A.): Malignant melanomas.
Lancet 1968 I, 76
170. (o.A.): Antigens in human sarcomas and melanomas.
Br. Med. J. 1969 III, 543
171. OIKAWA, A.; NAKAYASU, M.; NOHARA, M.: Tyrosinase activities of cell-free extracts and living cells of cultured melanoma cells.
172. OTT, F.: Vergleichende Untersuchungen bei verschiedenen Tiermelanomen.
Schweiz. Med. Wschr. 100, 958 (1970)

173. OUCHTHERLONY, O.: Diffusion in gel methods for immunological analysis. I, II.
Progr. Allerg. 5, 1 (1958); 6, 30 (1962)
174. PARR, J.: Response of syngeneic murine lymphomata to immunotherapy in relation to the antigenicity of the tumor.
Br. J. Cancer 26, 174 (1972)
175. PHILLIPS, T.M.; LEWIS, M.G.: A method for elution of immunoglobulin from the surface of living cells.
Rev. Europ. Etudes Clin. Biol. 1971 XVI, 1052
176. PREHN, R.T.: Tumor-specific antigens of putatively non-viral tumors.
Cancer Res. 28, 1326 (1968)
177. PRESSMAN, P.I.: Malignant melanoma and the breast.
Cancer 31, 784 (1973)
178. PRIMACK, A.; DHURU, D.; KIRYABWIRE, J.W.M.; VOGEL, C.L.: Clinical trials of combination chemotherapy with BCNU and vincristine in the treatment of malignant melanoma in Uganda.
Cancer 31, 337 (1973)
179. PRIMUS, F.J.; WANG, R.H.; GOLDENBERG, D.M.; HANSEN, H.J.: Localization of human GW-39 tumors in hamsters by radiolabeled heterospecific antibody to carcinoembryonic antigen.
Cancer Res. 33, 2977 (1973)
180. RAINER, H.; PILLER, G.; DEUTSCH, E.; MOSER, K.: Reverse Transkriptaseaktivitäten im Plasma einer Patientin mit Mammacarcinom.
Klin. Wschr. 51, 1076 (1973)
181. RAPP, W.; ARONSON, S.B.; KUSHNER, J.; BURTIN, P.; GRABAR, P.: Les antigènes de la muqueuse gastrique cancéreuse humaine.
In: (GRABAR, P.; MIESCHER, P.): Immunopathology, IVth International Symposium. Basel 1966

182. RAUSCHER, F.J.: A virus-induced disease of mice characterized by erythrocytopoiesis and lymphoid leukaemia.
J. Nat. Cancer Inst. 29, 515 (1962)
183. RAUSCHER, F.J.: Major opportunities for determination of ethiologies and prevention of cancers in man.
In: Recent Advances in human tumor virology and immunology. Tokyo 1971
184. REINER, J.; SOUTHAM, C.M.: Further evidence of common antigenic properties in chemically induced sarcomas of mice.
Cancer Res. 29, 1814 (1969)
185. REIS, H.E.: Die Bedeutung der Immunsuppression für die Entstehung und das Wachstum maligner Geschwülste.
DMW 96, 168 (1971)
186. ROMSDAHL, M.M.; COX, S.A.: Human malignant melanoma antibodies demonstrated by immunofluorescence.
Arch. Surg. 100, 491 (1970)
187. ROUS, P.: Transmission of a malignant new growth by means of a cell-free filtrate.
J. Am. Med. Ass. 56, 198 (1911)
188. RUHL, E.; CAMPHAUSEN, G.; KURISUMOOTIL, C.: Verhalten einzelner Blutlymphozytentypen in verschiedenen Tumorausbreitungsstadien.
Blut 23, 216 (1971)
189. SADOFF, L.; WINKLEY, J.; TYSON, S.: Is malignant melanoma an endocrine-dependent tumor? The possible adverse effect of estrogen.
Oncology 27, 244 (1973)
190. SANDRITTER, W.; BENEKE, G.: Allgemeine Pathologie.
Stuttgart 1974
191. SCANLON, E.P.; HAWKINS, R.A.; FOX, W.W.; SMITH, W.S.: Fatal homotransplanted melanoma. A case report.
Cancer 18, 782 (1965)

192. SCHENK, E.A.; SAKAI, A.; SAVLOV, E.; PATTERSON, B.W.:
Relationship of IgG and IgM anti-malignant melanoma
antibodies to stage of the tumor.
Fed. Proc.
193. SCHLIPKÖTER, H.-W.; IDEL, H.; BARSOUM, A.L.; VOLLMER,
U.J.: Tumorcharakteristische Antigene in Bronchial-
carcinomen.
Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B 158, 109 (1973)
194. SCHLOM, J.; SPIEGELMAN, S.: Simultaneous detection
of reverse transcriptase and high molecular weight
RNA unique to RNA virusus.
Science 174, 840 (1971b)
195. SCHMIDT-RUPPIN, K.H.: Heterotransplantation of Rous
sarcoma and Rous sarcoma virus to mammals.
Oncologia 17, 247 (1964)
196. SCHNYDER, U.W.: Klinik und Differentialdiagnose des
malignen Melanoms.
Schweiz. Med. Wschr. 100, 963 (1970)
197. SCHULER, D.: Maligne Tumoren und Immunität
Therapia Hungarica 3, 95 (1972)
198. SCOLNICK, E.M.; PARKS, W.P.: Isolation and characteri-
sation of a primate sarcoma virus: mechanism of rescue.
Int. J. Cancer 12, 138 (1973)
199. SEIGLER, H.F.; SHINGLETON, W.W.; METZGAR, R.S.;
BUCKLEY, C.E.; BERGOC, P.M.; MILLER, D.S.; FETTER, B.F.;
PHAUP, M.B.: Non-specific and specific immunotherapy in
patients with malignant melanoma.
Surgery 72, 162 (1972)
200. SEGALL, A.; WEILER, O.; GENIN, J.; LACOUR, J.; LACOUR, F.:
In vitro study of cellular immunity against autochthonous
human cancer.
Int. J. Cancer 9, 417 (1972)

201. SHOPE, R.E.; HURST, E.W.: Infectious papilloma: toxins of rabbits with note on histopathology.
J. Exp. Med. 58, 607 (1933)
202. SIMMONS, R.L.; RIOS, A.: Combined use of BCG and neuraminidase in experimental tumor immunotherapy.
Surgical Forum
203. SMITH, J.L.; STEHLIN, J.S.: Spontaneous regression of primary malignant melanomas with regional metastases.
Cancer 18, 1399 (1965)
204. SMITHERS, D.W.: On the nature of neoplasia in man.
London 1964, S. 115
205. SJÖGREN, H.O.; HELLSTRÖM, J.; KLEIN, G.: Resistance of polyoma virus immunized mice to transplantation of established polyoma tumours.
Exp. Cell Res. 23, 204 (1961a)
206. SPIEGELMAN, S.; BURNY, A.; DAS, M.R.; KEYDAR, J.; SCHLOM, J.; TRAVNICEK, M.; WATSON, K.: Characterization of the products of RNA-directed DNA-polymerases in oncogenic RNA viruses.
Nature 227, 563 (1970)
207. SPIEGELMAN, S.: Biochemistry of transformation by RNA tumour viruses.
Zentralblatt 220, 26 (1972)
208. STEHLIN, J.S.: Malignant melanoma: an appraisal.
Surgery 64, 1149 (1968)
209. STEWART, S.E.; EDDY, B.E.: Tumor induction by SE polyoma virus and the inhibition of tumors by specific neutralizing antibodies.
Am. J. Pub. Health 49, 1943 (1959)
210. STRAND, M.; AUGUST, J.T.: Structural proteins of mammalian oncogenic RNA viruses: multiple antigenic determinants of the major internal protein and envelop glycoprotein.
J. Virol. 13, 171 (1974)

211. STUART-HARRIS, C.: Whither virology? Trends and prospects in medical research.
Postgraduate Med. J. 50, 1 (1974)
212. SUMNER, W.C.; FORAKER, A.G.: Spontaneous regression of human melanoma. Clinical and experimental studies.
Cancer 13, 79 (1960)
213. SYMES, M.O.; RIDDELL, A.G.; IMMELMANN, E.J.; TERBLANCHE, J.: Immunological competent cells in the treatment of malignant disease.
Lancet 1968 II, 1054
214. TAKEDA, K.; AIZAWA, M.; KIKUCHI, Y.; YAMAWAKI, S.; NAKAMURA, K.: Tumor auto-immunity against methylcholantrene induced sarcomas of the rat.
Grann 57, 221 (1966)
215. TEE, D.E.; WANG, M.; WATKINS, J.: Antigenic properties of human tumors. "Tumorspecific antigens".
Europ. J. Cancer 1, 315 (1965)
216. TEIMOURIAN, B.; MCCUNE, W.C.: Surgical management of malignant melanoma.
Surgery 29, 515 (1963)
217. TEMIN, H.M.: Mechanism of cell transformation by RNA tumor viruses.
Ann. Rev. Microbiol. 25, 609 (1971)
218. TEMIN, H.M.: The participation of DNA in Rous sarcoma virus production.
Virology 23, 486 (1964)
219. THOMPSON, D.M.P.: Diagnosis of human digestive system cancer by radioimmunoassay of carcinoembryonic antigen.
Ann. Roy. Coll. Phys. Surg. Canada July 1971
220. TREPEL, F.: Tumorantigene und Immunreaktionen gegen Tumoren.
Med. Klin. 66, 215 (1971)

221. TRITSCH, H.: Antigenität des Harding-Passey-Melanoms bei Transplantationsversuchen.
Arch. Derm. Forsch. 245, 245 (1972)
222. VAAGE, J.: Non-cross-reacting resistance to virus-induced mouse mammary tumors in virus infected CHJ mice.
Nature 218, 101 (1968)
223. VAAGE, J.; KALINOVSKY, T.; OLSON, P.: Antigenic differences among virus-induced mouse mammary tumors arising spontaneously in the same C3H/Crgl host.
Cancer Res. 29, 1452 (1969)
224. VERONESI, U.: Programmation thérapeutique et pronostic des mélanomes malins.
Schweiz. Med. Wschr. 100, 976 (1970)
225. VOLM, M.; BASTERT, G.; MATTERN, J.; WAYSS, K.: Onkobiogramm und Therapieerfolg bei Transplantationstumoren.
Naturwissenschaften 60, 395 (1973)
226. DEVRIES, J.E.; RÜMKE, P.: Immunological studies in melanoma patients treated with BCG.
Br. J. Cancer 28, Suppl. I, 97 (1973)
227. DEVRIES, J.E.; RÜMKE, P.; BERNHEIM, J.L.: Cytotoxic lymphocytes in melanoma patients.
Int. J. Cancer 9, 567 (1972)
228. WALLACE, D.C.; EXTON, L.A.; MCLEOD, G.R.C.: Genetic factor in malignant melanoma.
Cancer 27, 1262 (1971)
229. WARNATZ, F.: Tumorummunologie
Stuttgart 1974
230. WEIDNER, F.; HORNSTEIN, O.P.: Untersuchungen zur prognostischen Bedeutung der Stromareaktion beim malignen Melanom. II. Entzündliches Infiltrat und Prognose.
Virchows Arch. Path. Anat. 359, 77 (1973)

231. WEINER, R.S.; HUSSARD, J.D.; MARDINEY, M.A.: Production of tumour. Specific antibody in the xenogeneic host: use of blocking antibodies.
J. Nat. Cancer Inst. 49, 1063 (1972)
232. WEISS, D.W.: Current aspects of tumor immunology.
Israel J. Med. Sci. 9, 205 (1973)
233. VANWIJCK, R.; BOUILLENNE, C.: HL-A antigen and susceptibility to malignant melanoma.
Transplantation 16, 371 (1973)
234. WOLF, A.; BARFOOT, R.K.; JOHNSON, R.A.: Xenogeneic recognition of tumor specific plasma membrane antigens derived from mouse lymphoma cells.
Immunology 22, 485 (1972)
235. WOOD, W.C.: Antibody in sarcoma patients cytotoxic to human sarcoma cells.
In: MORTON, D.L. (Moderator): Immunological aspects of neoplasia: a rational basis for immunotherapy.
Ann. Intern. Med. 74, 587 (1971)
236. WOODRUFF, M.F.A.; BOAY, J.L.: Inhibiting effects of injection of *C. parvum* on the growth of tumor transplantation in isogeneic hosts.
Br. J. Cancer 20, 345 (1966)
237. YONEMOTO, R.H.; TERASAKI, P.I.: Cancer immunotherapy with HL-A compatible thoracic duct lymphocyte transplantation.
Cancer 30, 1438 (1972)
238. ZBAR, B.; WEPSIC, H.T.; RAPP, H.J. BORSOS, T.; KRONMAN, B.S.; CHURCHILL, W.H.: Antigenic specificity of hepatomas induced in strain-2 guinea pigs by dimethylnitrosamine.
J. Nat. Cancer Inst. 43, 833 (1969)
239. ZIEGLER, J.L.; LEWIS, M.G.; LUYOMBYA, J.M.S.; KIRYABWIRE, J.W.M.: Immunologic studies in patients with malignant melanoma in Uganda.
Brit. J. Cancer 23, 729 (1969)
240. ZILBER, L.A.: Studies on tumor antigens.
J. Nat. Cancer Inst. 18, 341 (1957)

Herrn Prof. Dr. Dr. Walter Brendel danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes am Institut für Chirurgische Forschung und für seine ständigen Ratschläge und Anregungen im Verlauf der Arbeit.

Für die Einführung in die theoretische und praktische Immunologie danke ich besonders Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. Claus Hammer.

Herrn Prof. Dr. Fritz Miller möchte ich für die Möglichkeit danken, am Institut für Zellbiologie der Universität München Untersuchungen durchführen zu lassen.

Herrn Priv.-Doz. Dr. G. Birkmayer danke ich für kritische Hinweise auf dem Gebiet der Tumorstudiologie.

Für technische Hilfe möchte ich mich bei Fräulein Annemarie Allmeling, Fräulein Gabriele Brons, Fräulein Hannelore Graber, Fräulein Gudrun Höbel vom Institut für Chirurgische Forschung und bei Fräulein Anne Reichert vom Institut für Zellbiologie bedanken.

Lebenslauf

Geboren: 3. Mai 1945 in Diez/Lahn
Mutter: Christiane Eberhard geb. Kuhlmann
Vater: Dr. med. Heinz Eberhard, Landarzt
Schulzeit: von 1951 - 1955 Volksschule
von 1955 - 1965 Besuch des humanistischen
Wilhelm-Gymnasiums in Braunschweig
Abitur am 16. 2. 1965
Militär: Ableistung des Wehrdienstes vom
1. 4. 1965 - 30. 9. 1966 bei der Marine
Studium: ab WS 1966 Beginn des Studiums der Philo-
sophie, Geschichte, Germanistik und Kunst-
geschichte an der Universität München,
Beginn des Medizinstudiums im SS 1970,
medizinisches Staatsexamen am 16. 12. 1975
Seit dem 1. 1. 1976 bin ich als Medizinalassistent am
Institut für Chirurgische Forschung der Chirurgischen
Universitätsklinik München tätig.

